

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

**Diplomová práce**

**Identifikace trichologického materiálu metodou High Resolution  
Melting vybranými SNPs ve forenzní praxi**

Forensic SNP identification of trichological material by High Resolution  
Melting analysis

**Bc. Joanne Strobachová**

**Praha 2013**

**Vedoucí práce: Mgr. Vlastimil Stenzl**

## **Čestné prohlášení**

*Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně a s použitím literatury uvedené v seznamu literatury.*

*Joanne Strobachová*

## Poděkování

*Ráda bych vyjádřila poděkování za ochotu a cenné rady vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Vlastimilu Stenzlovi a za odborné konzultace v biostatistice Mgr. Anastásiyi Zídkové.*

*Dále bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi za poskytnutí zázemí a všestranné podpory. Mé velké díky patří i mým zaměstnavatelům Bertovi a Ivance van der Maas za toleranci a vstřícný přístup při dokončování této práce.*

*Tuto práci věnuji památce mého dědy Jana Zikmunda, který mi byl a je velkým vzorem a inspirací.*

# Obsah:

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	7
2.	ABSTRAKT .....	9
3.	ÚVOD .....	11
4.	CÍLE PRÁCE.....	13
5.	TEORETICKÝ ÚVOD.....	14
5.1.	OCHLUPENÍ LIDSKÉHO TĚLA .....	14
5.1.1.	STAVBA VLASU .....	15
5.1.2.	FÁZE RŮSTU .....	16
5.2.	MITOCHONDRIÁLNÍ DNA .....	19
5.2.1.	MITOCHONDRIE .....	20
5.2.2.	STAVBA MTDNA .....	20
5.2.3.	NOMENKLATURA MUTACÍ MTDNA .....	22
5.2.4.	DĚDIČNOST MTDNA .....	22
5.2.5.	MTDNA HAPLOSKUPINY .....	23
6.	MATERIÁL .....	27
6.1.	SADA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU V ANAFÁZI .....	27
6.2.	SADA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU V TELOFÁZI.....	29
6.3.	SADA BUKÁLNÍCH STĚŘŮ UŽITÁ K OPTIMALIZACI VYBRANÝCH PRIMERŮ .....	31
7.	METODY .....	32
7.1.	IZOLACE DNA .....	32
7.1.1.	IZOLACE DNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	32
7.1.2.	IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍCH STĚŘŮ.....	34
7.2.	KVANTIFIKACE DNA .....	35
7.2.1.	KVANTIFIKACE NDNA BUKÁLNÍCH STĚŘŮ .....	36
7.3.	AMPLIFIKACE POMOCÍ PCR .....	36
7.4.	METODA HIGH RESOLUTION MELTING .....	39

7.5.	VÝBĚR SNP A PŘÍSLUŠNÝCH PRIMERŮ .....	46
7.5.1.	OBECNÉ SCHÉMA OPTIMALIZACE PRŮBĚHU AMPLIFIKACE .....	49
7.5.1.1.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 1.....	50
7.5.1.2.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 2.....	52
7.5.1.3.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 3.....	53
7.6.	SEKVENACE MTDNA .....	53
7.6.1.	PROTOKOL SEKVENACE .....	55
7.6.1.1.	AMPLIFIKACE .....	56
7.6.1.2.	PURIFIKACE AMPLIFIKÁTU I.....	56
7.6.1.3.	SEKVENAČNÍ REAKCE .....	58
7.6.1.4.	PURIFIKACE AMPLIFIKÁTU II.....	59
7.6.1.5.	STANOVENÍ SEKVENCE MTDNA .....	59
8.	VÝSLEDKY .....	62
8.1.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU G3010A A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY .....	62
8.1.1.	ANALÝZA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....	65
8.2.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU C7028T A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY .....	67
8.2.1.	ANALÝZA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....	70
8.3.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU C14766T A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY .....	72
8.3.1.	ANALÝZA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....	75
8.4.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERŮ A2706G A G12372A A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY .....	77
9.	DISKUSE.....	78
9.1.	ANALYZAČNÍ PROGRAM .....	78
9.2.	ÚSPĚŠNOST IZOLACE MTDNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....	78
9.3.	DISKUSE K VÝSLEDKŮM ANALÝZY TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU POMOCÍ METODY HRM .....	80

9.3.1.	PRIMER G3010A .....	80
9.3.2.	PRIMER C7028T .....	81
9.3.3.	PRIMER C14766T .....	83
9.4.	ZAŘAZENÍ ANALYZOVANÝCH VZORKŮ DO HAPLOSKUPIN .....	83
9.5.	VYUŽITÍ VE FORENZNÍ GENETICE.....	84
10.	ZÁVĚR .....	85
11.	POUŽITÁ LITERATURA.....	86
12.	PŘÍLOHY .....	91
12.1.	TABULKY .....	91
12.2.	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ .....	95
12.3.	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ.....	96

## 1. Seznam použitých zkratk

A	adenin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
C	cytosin
CE	kapilární elektroforéza
CRS	Cambridge Reference Sequence
Ct hodnota	bod, kdy došlo k zaznamenání míry fluorescence nad určitou hranici
ddATP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro adenin
ddCTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro cytosin
ddGTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro guanin
ddNTP	terminační deoxyribonukleotidové báze
DTT	dithiotreitol
ddTTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro thymin
dH <sub>2</sub> O	ultračistá denaturovaná voda bez nukleáz
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidové báze
Dol. kvart.	dolní kvartil
ds DNA	dvoušroubovicové DNA
FGF 7	fibroblastový růstový faktor 7
G	guanin
HCN laboratoř	High Copy Number laboratoř
Hor. kvart.	horní kvartil
HpaI	restrikční enzym
HRM	High resolution melting
HV-I	hypervariabilní oblast 1
HV-II	hypervariabilní oblast 2
HV-III	hypervariabilní oblast 3
IGF 1	inzulínu podobný růstový faktor 1
KÚP	Kriminalistický ústav Praha
LCN laboratoř	Low Copy Number laboratoř
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
mtDNA	mitochondriální DNA

mtMRCA	„mitochondriální Eva“, v mateřské linii společný předek všech dnes žijících lidí
nDNA	jaderná DNA
PCR	Polimerase Chain Reaction
PK	Proteináza K
rCRS	zrevidovaná CRS
RFU	relativní fluorescenční jednotka (relative fluorescence units)
rpm	počet otáček za minutu
RT-qPCR	kvantitativní Real-time PCR
Sm. Odch.	směrodatná odchylka
SNaPshot	analyzační metoda stanovující variantu nukleotidu SNP
SNP	jednobázový polymorfismus
SNPs	jednobázové polymorfismy
ss DNA	jednošroubovice DNA
STR	krátké tandemové repetice
T	thymin
T <sub>m</sub>	teplota tání
T <sub>m</sub> ax	teplota tání izolátu axilárního ochlupení,
T <sub>m</sub> buk	teplota tání izolátu bukálního stěru
T <sub>m</sub> pub	teplota tání izolátu pubického ochlupení
T <sub>m</sub> vl	teplota tání izolátu vlasů
T <sub>m</sub> 1	teplota tání, první z dvojice měření
T <sub>m</sub> 2	teplota tání, druhá z dvojice měření



## 2. ABSTRAKT

Analýza mitochondriální DNA (mtDNA) vlasů v telofázi hraje důležitou úlohu ve forenzním vyšetřování především z důvodu, že vlasy v telofázi jsou běžným typem biologických stop zanechaných na místě činu. Tento typ stop se vyznačuje častou absencí jaderné DNA, a tak není možné aplikovat standardní identifikační metody pomocí analýzy STR repetice. Vzhledem k časové a finanční náročnosti analýzy mtDNA není možné tuto analýzu provádět standardním postupem, který není využitelný ani jako screeningová metoda. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli analyzovat mtDNA separovanou z trichologického materiálu a identifikovat jej na základě analýzy vybraných SNPs metodou High Resolution Melting (HRM). Abychom potvrdili shodnost mtDNA u různého typu biologického materiálu jednotlivce (bukální stěr, trichologický materiál v anafázi - vlasy, axilární ochlupení, pubické ochlupení), byly analyzovány takovéto sady od 12ti osob. Dále se analyzovala série bukálních stěrů a vlasů v telofázi od 17ti jedinců.

Z celkového množství pěti vybraných SNP se podařila optimalizace analýzy tří SNP lokalizovaných na mtDNA. U pozic G3010A, C14766T je možná analýza trichologického materiálu v anafázi a telofázi. Možnost analýzy SNP C7028T je potvrzena pouze u trichologického materiálu v anafázi. Analýzou vybraných SNP pomocí námi optimalizované metody HRM se podařilo prokázat nezávislost genotypizační metody na typu biologického materiálu jedince a pro užití těchto SNP byl připraven protokol, který je možné užít ve forenzní praxi.

Klíčová slova: forenzní, antropologie, mtDNA, SNP, HRM, trichologický materiál, anafáze, telofáze

## ABSTRACT

The analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) from shed hairs has gained high importance in forensic casework since telogen hairs are one of the common type of evidence left at the crime scene. This type of evidence very often lack of nuclear DNA (nDNA), so the identification based on the STR analysis is not possible. The analysis of trichological material lacking nDNA is not a commonly used method of the forensic praxis because of the high price of the regularly used mtDNA analysis method, as well as the time demandingness.

Based on this, the main goal of this work is to establish a relatively fast, easy and cheap method able to analyze trichological material lacking of nDNA. For these reasons we decided to analyze the mtDNA and identify the trichological material by analysis of chosen SNP's followed by High Resolution Melting.

We have analyzed 12 series of different biological materials that belongs to one person (e.g. buccal cells, trichological material in anagen - head, axillary and pubic hair shafts) in order to confirm the identity of mtDNA isolated from different type of biological materials. We have analyzed several set's of buccal cells and head hair shafts in telogen from 17 specimens.

From total number of 5 selected SNP's, this essay was able to optimize analysis of 3 SNP's. Due to the analysis of SNPs G3010A, C14766T (applicable for the trichological material in anaphase and telophase) and C7028T (applicable only for the trichological material in telophase). The mtDNA sequences of different biological materials did not show intraindividual differences. Protocol that could be usable for the forensic praxis with the use of optimized SNP's was prepared based on this research.

Key words: forensic, anthropology, mtDNA, SNP, HRM, trichological material, anagen, telogen

### 3. ÚVOD

Ačkoliv je trichologický materiál (jako jsou vlasy a chlupy) jednou z častých stop na místě činu, analýza tohoto typu stop se ve forenzní praxi rutinně neprovádí. Důvodů je celá řada. Jelikož tento typ trichologického materiálu ve většině případů neobsahuje jadernou DNA (dále jen nDNA), například protože je daný trichologický materiál v telofázi (viz dále) anebo je nDNA poškozena, není možná identifikace analýzou STR repetit. Je tedy možné zkoumat pouze mtDNA, k čemuž se nejčastěji užívá sekvenace hypervariabilních oblastí mitochondriálního genomu. Nevýhodou této metody je její finanční a časová náročnost, tudíž se tyto vzorky sekvenací vyšetřují například v případě nízkého počtu stop z místa činu.

Rádi bychom proto nabídli alternativu a možnost analýzy trichologického materiálu, díky které by bylo možné relativně levně, rychle a jednoduše získat informace o tomto typu stop.

Za daných podmínek se jako nejvhodnější metoda k analýze trichologického materiálu jevila metoda High resolution melting (HRM), při které se analyzují vybrané SNPs lokalizované na mtDNA. Metoda HRM se osvědčuje především pro svou relativní nenáročnost po materiální i finanční stránce. Byly vybrány takové SNPs, které zároveň stanovují nejčtenější evropské haploskupiny. Výběr těchto haploskupin měl zaručit zachycení nukleotidových variant vybraných SNPs. Principem metody HRM je stanovení teploty tání amplifikátu, díky které je možné stanovit nukleotidovou variantu vyšetřovaného SNP.

Na základě studie (Pfeiffer et al, 1999) bylo potvrzeno, že není rozdíl mezi mtDNA různého trichologického materiálu (vlasy, axilárního a pubického ochlupení) a bukalního stěru separovaného z jednoho jedince. Toto tvrzení bychom rádi ověřili pro možnost užití námi testované metody HRM ve forenzní praxi k analýze trichologického materiálu, u kterého není možné analýza nDNA.

V této studii byly testovány dvě sady trichologického materiálu - trichologický materiál v anafázi a v telofázi. Sady trichologického materiálu obsahovaly vlasy a axilární a pubické ochlupení. Z důvodu vlastní realizace sběru představuje tento soubor typ

materiálu, který díky umělým vlivům (odstranění kořínků) neobsahuje nDNA. Současně bylo možné porovnat izoláty mtDNA většího množství typů biologického materiálu jedince. Soubor trichologického materiálu v telofázi umožnil analyzovat materiál, který nDNA přirozeně neobsahuje.

## 4. CÍLE PRÁCE

Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny následující cíle:

- Vytipování vhodných SNPs (lokalizovaných na mtDNA) pro metodu HRM.
- Optimalizace amplifikační reakce / reakce HRM pro každý pár primerů dané SNP pozice.
- Ověření individuální shody DNA u různých typů trichologického materiálu.

Pro tuto práci byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ):

Teplota tání mtDNA izolované z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. To by znamenalo, že a z hlediska genetické analýzy jde o rovnocenný materiál.

- Ověření možnosti zařazení analyzovaných vzorků do haploskupin.
- optimalizace metody pro možné užití ve forenzní praxi

## 5. TEORETICKÝ ÚVOD

Jednou ze základních tezí forenzní vědy je tzv. Locardův princip. Tento princip říká, že každý kontakt za sebou zanechává stopu. Tuto tezi lze v praxi interpretovat tak, že pachatel trestné činnosti zanechá stopu — ať již na místě činu či na své oběti, ale zároveň si také odnáší stopy místa činu nebo oběti.

Nejčastěji analyzovaným typem trichologického materiálu ve forenzní genetice jsou vlasy a pubické ochlupení (Deedrick, 2000). Uvádí se, že až 75% stop zanechaných na místě činu je právě zanechaný trichologický materiál (Petraco, 1985). Tato je dáno především vysokou měrou samovolného uvolňování vlasů v poslední růstové fázi, přibližně 50 až 150 vlasů denně (Paul, Cotsarelis, 1999), dále poměrně snadným rozpoznáním, danou rozměry a v neposlední řadě odolnost vlasového stvolu vůči degradačním vlivům.

### 5.1. Ochlupení lidského těla

Vlasy a ochlupení pokrývá celé tělo, krom dlaní rukou a chodidel. Ochlupení z oblastí jako je hlava, hrud', oblast třísel a podpaží či končetin má vlastní charakteristické mikroskopické znaky pro danou oblast růstu. Folikuly, ze kterých vlasy a ochlupení vyrůstá, se liší ve své šířce i tvaru v závislosti na místě růstu, základní struktura je však vždy stejná.

Na lidském těle se rozlišuje 3 typy ochlupení (dle Říhové, 1951):

- chmýří (lanugo), jedná se o jemný a krátký typ vlasů, velmi slabě pigmentované a nemající dřeh
- terminální vlasy dlouhé, kam se řadí vlasy kštice, ochlupení podpaží, ochlupení ohanbí a vousy. Pro tento typ vlasů je společné dobrá pigmentace. Dřeh se u vlasů kštice často vyskytuje pouze u báze kořínku, u ostatních typů vlasů se vyvíjí po celé délce
- terminální vlasy krátké, též nazývané vlasy štětinovitými. Do této kategorie patří řasy, obočí, chlupy nozder a zvukovodu.

V době narození pokrývá lidské tělo na 5 milionů vlasových folikul (Paulus, Cotsarelis, 1999) a toto množství se již v průběhu života nemění. Mění se pouze velikost folikulů, a to především vlivem androgenů, thyroidních hormonů, glukokortikoidu, prolaktinu či růstových hormonů. Vliv testosteronů a jeho aktivního metabolitu, dihydrotestosteronu, je dobře patrný v období adolescence, kdy pod jeho vlivem dochází ke zvětšení (rozšíření) vlasových folikul v oblasti vousů. Naopak v pozdějším věku ty samé hormony vlivem na folikuly oblasti hlavy mohou způsobit miniaturizaci vlasových folikul. Toto způsobí, že místo dlouhého terminálního vlasu je produkován vlas typu lanugo, což se opticky jeví jakožto masivní úbytek vlasů (androgenní alopecie) (Oman et al, 1997). Umístění a distribuce folikulů je dána geneticky, zárodky folikulů jsou zakládány v devátém týdnu těhotenství (Morioka, 2005).

### **5.1.1.Stavba vlasu**

V podélné ose je možné rozlišit vlasový folikul a stvol vlasu (dle Robbins, 1988).

#### **Stavba vlasového folikulu**

Vlasový folikul je vlasotvorným orgánem uloženým v epidermální vrstvě kůže, celý útvar je uložen ve vnější vlasové pochvě. Tato vnější kořenová pochva se skládá ze dvou vrstev epiteliálního původu, které navazují na vnější vazivovou pochvu folikulu (Marioka, 2005). Distální část folikulu nepodléhá cyklickým změnám růstu a vlasů. Do této části řadíme mazové žlázy a sval napřimovač vlasu (*musculus arrector pili*). Proximální konec vlasového folikulu se nazývá vlasová cibulka (*bulbus pili*), tato část folikulu přímo odpovídá za růst vlasu. Ze spodu vlasové cibulky se vnořuje dermální papila obsahující krevní kapiláry, které přivádějí živiny vlasové cibulce. Zároveň se zde nachází androgenní receptory, přes které dochází k hormonálnímu ovlivnění metabolické funkce folikulu (Kaufman, 1996). Nad dermální papilou se nachází prekeratinizační oblast, kde se buňky připravují na keratinizaci. Nejvyšší vrstvou horní části vlasové cibulky je keratogenní oblast, kde dochází k zaplnění buněk keratinem a vlasové buňky umírají. (Marioka, 2005). Po průchodu keratogenní oblastí je již vlasový stvol plně keratinizován. Poslední částí vlasového folikulu je folikulární kanál, který začíná od vyústění mazové žlázy a ústí na povrchu pokožky.

### Stavba vlasového stvolu

Vlasový stvol se na příčném řezu skládá ze dřene, kůry a kutikuly (Říhová, 1951). Jelikož v každém z těchto úseků probíhá keratinizace jiného typu, vlas není mikroskopicky jednotný a tak lze jednotlivé části vlasu rozlišit.

- **Dřeň** (*medulla*). Dřeň je tvořena pouze jednou až dvěma řadami zrohovatělých buněk, které vznikly z keratinocytů lokalizovaných na vrcholu dermální papily. Buňky mají nepravidelný, hvězdicovitý tvar a buňky jsou často vyplněny vzduchem. Dřeň se nevyskytuje vždy, například v silnějších vlasech je často vyvinuta pouze v oblasti kořene. Naopak vlasy vousu mají dřeň silně vyvinutou.
- **Kůra** (*cortex*). Kůra vlasového stvolu vzniká z masy buněk pokrývající boky a částečně vrchol dermální papily. Keratinocyty jsou protáhlé ve směru podélné osy vlasu a nabývají vřetenovitého tvaru. Buňky jsou mezi sebou pevně pospojovány tonofibrily. Charakteristicky se vyskytují váčky s obsahem melaninu, které mohou být roztroušeny či podélně seřazeny. Vzduchové váčky se téměř neobjevují.
- **Kutikula** (*cuticula*). Tato vrstva vzniká z buněk zárodečné masy, která leží na bocích dermální papily zevně od buněk, které tvoří kůru vlasu. Tyto buňky nefagocytují vezikuly s pigmenty, tudíž jsou transparentní. Buňky kutikuly jsou zrohovatělé buňky, které jsou plochými šupinami, navzájem se překrývající. Okraje šupin mají nepravidelný okraj, který směřuje ke špičce vlasu. Kutikula má ochrannou funkci jádra vlasu, chrání před chemickými vlivy, jako je průnik škodlivých látek do vlasu či ochraňuje před mechanickým poškozením.

### 5.1.2.Fáze růstu

Růst vlasů a ochlupení charakterizují tři fáze růstu, které se cyklicky opakují. Vlasy se v jednotlivých fázích liší jak morfologicky, tak histologicky. Protože folikuly jsou na sobě metabolicky nezávislé, v jeden okamžik se na povrchu těla vyskytují vlasy či ochlupení všech tří fází. Fáze růstu jsou zobrazeny v Obrázku č. 1.



- **Anagenní fáze** je období růstu vlasového stvolu díky vysoké metabolické aktivitě folikulu vlasu. V proliferační oblasti vlasového kořínku, v oblasti dermální papily, dochází k vývoji keratinocytů ze zárodečných buněk. K diferenciaci keratinocytů ze zárodečné matrix dochází na základě signálů z dermální papily. Tím jak se buňky mitoticky dělí a posouvají od cibulky k povrchu, formují vlastní vlas i vnitřní kořenové pochvy vlasů (Taylor et al, 2000). Zpočátku jsou tyto buňky nediferencované a mají kulaté jádro. Postupným vytlačováním k vyšším pasážím vlasové cibulky se zvětšuje jejich objem a vertikálně se prodlužují. Buňky, které se při svém vzniku nacházejí nad vrcholem dermální papily, jsou budoucími buňkami dřeně vlasu, směrem k okraji vznikají buňky kůry vlasu a vlasové kutikuly. Buňky nacházející se na okrajích nově vzniklých buněk dají vzniknout vnitřní kořenové pochvě, což jsou vrstvy kutikuly vnitřní kořenové pochvy, Huxleyově vrstvě a Henleově vrstvě. Pigmentace vlasových buněk je zajištěna díky aktivitě melanocytů. Melanocyty jsou buňky produkující melanin a nachází se v oblasti dermální papily. Melanin je produkován ve váčcích, které se transportují do vyšších vrstev mezibuněčného prostoru vlasové cibulky, kde dojde k jejich fagocytóze keratinocyty.

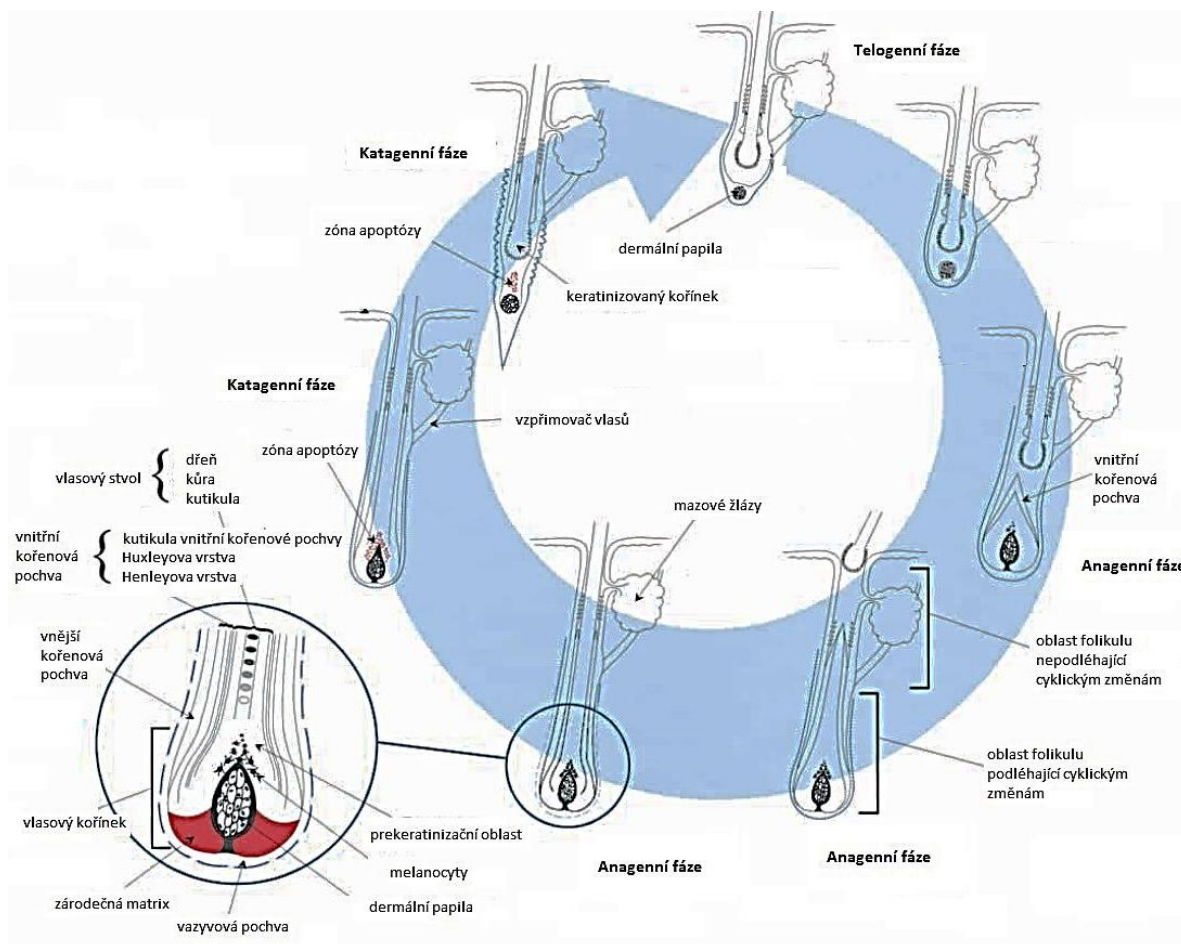
Tím, jak se buňky posouvají směrem k ústí vlasového folikulu, dostávají se až do keratogení zóny, kde dochází k jejich keratinizaci a postupné programované smrti. V průběhu keratinizace dochází k aktivaci endonukleázy DNase1L2, která selektivně naštěpuje jadernou DNA, a především pak histony (Fischer et al, 2007). Odstranění nDNA a histonů se ukazuje jako důležitý krok umožňující jak zvětšit prostor v buňce (a tím umožňující lepší rozmístění keratinocytů v rámci buňky), tak i z důvodu, že přetrvávající přítomnost histonů v keratinizované buňce zhoršuje fyzikální vlastnosti keratinních vláken, jako je pružnost a pevnost.

V anagenní fázi růstu mají nejdůležitější signální roli sekretované hormony IGF 1 (inzulínu podobný růstový faktor 1) a FGF 7 (fibroblastový růstový faktor 7). Oba tyto růstové hormony jsou produkovány dermální papilou a vážou se na receptory zárodečné matrix (Danilenko et al, 1996). Délka této fáze odráží i možnosti délky vlasového stvolu.

Dle studie Andréasson et al (2006), která se zaměřila na kvantifikaci jaderné a mitochondriální DNA v různých typech forenzních materiálů, se v prvním centimetru vlasu (včetně kořínku), nachází v průměru 25 800 kopií nDNA a průměrně 3 500 000 kopií mtDNA. Další úsek vlasu (mezi 1-4 cm) obsahoval přibližně 40 200 kopií mtDNA na 1 cm. Množství jaderné DNA je ve většině případů dostačující k identifikaci osoby dle analýzy STR lokusů.

- **Katagenní fáze** je fází, kdy dochází k rapidnímu poklesu metabolické aktivity zárodečné matrix. Zároveň je spuštěna apoptóza v oblasti folikulárních keratinocytů, v oblasti nad dermální papilou (Slominski et al, 1994). Důsledkem apoptózy dojde k odloučení vnitřní vlasové pochvy, centrální části vlasu i živý kořen vlasu. Současně dojde ke zmenšení dermální papily. Spolu s oddělením vlasového stvolu dojde k přerušení dodávání živin a čerstvě oddělená část vlasu se stává mrtvým kořenem. Zmenšení dermální papily vede ke zmenšení vnitřního tlaku ve folikulu a dojde ke smrštění vazivové pochvy za současného pohybu vlasového stvolu k ústí vlasového folikulu (Říhová, 1951). Současně se dermální papila přibližuje ke svaly napřimovači vlasu (*musculus arrector pili*). Tato fáze trvá několik týdnů.
- **Telogenní fáze** je obdobím, kdy je již celý vlas, včetně kořínku, plně keratinizován. Kořen má zakulacený tvar a konec, který se jeví mírně roztřepen. Dermální papila se pomalu vrací na své původní místo a po dvou až třech měsících folikul přechází v anagenní fázi. K vypadnutí vlasu dochází často mírnými mechanickými vlivy či vytlačení nově rostoucího vlasu. V průběhu dne dochází k uvolnění od 50 do 150 vlasů v telogenní fázi (Paul, Cotsarelis, 1999). Dle publikované studie (Andréasson et al, 2006) se v tomto typu vlasu v prvním centimetru vlasového stvolu (kořínek byl zahrnut) nenacházela detekovatelná nDNA. V tomto úseku však průměrně obsahoval 45 700 kopií mtDNA, v dalším úseku (1-4 cm) se průměrně nacházelo 20 900 až 26 600 kopií mtDNA na 1 cm.

K obměně vlasů kůže dochází mozaikovitě — přibližně 80 — 90 % vlasů se nachází v anagenní fázi, 2 procenta v katagenní fázi a 10 — 18% v telogenní fázi (Dreik, 2002).



Obrázek č. 1. Fáze růstu vlasového folikulu podle Panteleyev et al (2001), upraveno.

## 5.2. Mitochondriální DNA

Standardní metodou užívanou k identifikaci jednotlivce ve forenzní genetice je analýza STR repetice (analýza krátkých tandemových repetice) lokalizovaných v jaderné DNA (nDNA). Tuto metodu je však možné spolehlivě užít pouze v případě, že se v izolátu DNA nachází adekvátní množství genetického materiálu dostačující kvality (Moretti et al, 2001). Užití analýzy STR úseků je omezené v případě zhoršené kvality nDNA, jako je její degradace v kratší úseky či úplný rozklad. Vzorky biologických materiálů, jako například staré kosti, zuby či vlasy, často obsahují velmi malé množství nDNA, což může být dáno jejím rozkladem či přirozeně velmi omezeným výskytem. Pro tento typ vzorků je výhodné užít analýzu mtDNA, neboť tato analýza je často úspěšnější než zkoumání nDNA, ačkoliv není možná individuální identifikace a diskriminační síla je nižší než u analýzy STR.

### 5.2.1. Mitochondrie

Mitochondriální DNA se nachází v semiautonomní organelle zvané mitochondrie. Ta je pravděpodobně prokaryotního původu a nachází se v cytoplazmě všech typů eukariotních buněk. Výskyt mitochondrie v eukariotní buňce je vysvětlován endosymbiotickou teorií, říkájící že pravděpodobně došlo k pohlcení proteobakterie proteoeukaryotickou buňkou za vzniku symbiózy. Mitochondrie je organela oválného tvaru, jejíž obvyklá velikost dosahuje rozměrů v řádu mikrometrů. Obal tvoří vnější a vnitřní membrána. Hlavní funkcí mitochondrie je vytvářet energii buňce procesem oxidační fosforylace v rámci Krebsova cyklu, kde produktem metabolického procesu je molekula ATP. Mezi další významné metabolické procesy patří například beta-oxidace mastných kyselin.

Počet mitochondrií v buňce není ustálen a její počet se liší dle nároku tkáně na přísun energie. V buňce se jich mohou vyskytovat desítky až tisíce. Počet kopií mtDNA v mitochondrii se pohybuje od 1 do 15. Experimentální studií byl stanoven průměrný počet mitochondrií v buňce na 107 kopií, každá mitochondrie má průměrně 4,6 mtDNA. Přibližný počet kopií mtDNA v buňce tedy činí v průměru 500 (Satoh, Kuroiwa, 1991). Každá buňka má pouze dvě kopie nDNA. Toto neplatí pro buňky gamet — zde se vykytuje pouze jedna kopie nDNA). Porovná-li se počet mitochondriální DNA s počtem jaderné DNA, je zcela zřejmé, že buňky obsahují o několik řádů větší množství mtDNA.

### 5.2.2. Stavba mtDNA

Mitochondriální DNA je kruhová dvouřetězcová molekula tvořená antiparalelními řetězci, které jsou vůči sobě komplementární. Základní stavební jednotkou vláken je nukleotid. Základními kameny nukleotidu jsou pětiuhlíkový sacharid 2-deoxy-D-ribosa, vazebný zbytek kyseliny fosforečné a nukleotidová báze. Kostru vlákna, takzvanou cukr-fosfátovou kostru, tvoří sacharid, na jejíž 5' uhlík se váže esterovou vazbou zbytek kyseliny fosforečné. Tento zbytek kyseliny fosforečné tvoří můstek, který se váže přes OH skupinu s předcházející 2-deoxy-D-ribosou (dalším nukleotidem).

Na 1' uhlík sacharózy se váže N-glykosidickou vazbou nukleové báze. Mezi deriváty purinu se řadí adenin (A) a guanin (G), deriváty odvozené od pyrimidinu jsou cytosin (C) a thymin (T). Vlákna mtDNA jsou propojena díky vazebným interakcím bází na základě zákona komplementarity. Dle tohoto zákona se k sobě vždy váže vodíkovými vazbami jedna báze purinu a jedna báze pyrimidinu - adenin a thymin přes dva vodíkové můstky, dále cytosin a guanin přes 3 vodíkové můstky.

Molekula mtDNA je dlouhá přibližně 16 569 párů bází a skládá se z takzvaného těžkého a lehkého řetězce. Těžký řetězec, též označovaný jako H-řetězec, je bohatší na puriny (A a především G). Druhý řetězec se označuje jako lehký neboli L-řetězec a dominují v něm nukleotidy skupiny pyrimidinu (T a C). Jelikož má guanin nejvyšší nukleotidovou hmotnost, jeví se H-řetězec při gradientové separaci těžší než L-řetězec (Scheffler 1999).

Řetězec mitochondriální DNA lze rozdělit na 2 oblasti — oblast kódující a kontrolní (nekódující) (Holland, Parson, 1999). V kódující oblasti se nachází 37 genů — 13 proteinů účastnících se oxidativní fosforylázy, dále 22 transferových RNA (nezbytných k translaci mtDNA) a 2 ribozomální RNA. Kontrolní oblast je dlouhá přibližně 1122 párů bází a tato část mtDNA nekóduje geny. Nachází počátek replikace H-řetězce, a to v oblasti zvané kontrolní úsek (D smyčka). Dále se zde vyskytují promotory těžkého a lehkého řetězce a nasedají zde transkripční faktory. V této oblasti též leží oblasti zvýšené frekvence vzniku mutací — hypervariabilní oblast 1 (HV-I), která se nachází mezi pozicemi 16024-1635 a hypervariabilní oblast 2 (HV-II), lokalizovaná mezi pozicemi 73-340. Pozice hypervariabilních oblastí, které mutují častěji než pozice ostatní, se nazývají hot spot. Mezi nejčastější typ mutace v této oblasti patří delece, inserce či repetice. Jelikož tato oblast nekóduje žádný důležitý protein, výskyt mutací v této oblasti není pro buňku fatální a je zde prostor pro zvýšenou variabilitu. V některých studiích se též pracuje s hypervariabilní oblastí 3 (HV-III), která leží v oblasti mezi pozicemi 438 — 574.

V roce 1981 se podařilo v laboratoři Fredericka Sanger v Cambridgi (Anderson et al, 1981) jako prvním osekvenovat mtDNA a osekvenovaná mtDNA byla označována jakožto CRS - Cambridge Reference Sequence (či též jako Andersonova sekvence). Každému nukleotidu této sekvence na L-řetězci bylo přiřazeno pořadové číslo. Pořadové číslo 1. bylo arbitrárně stanoveno přibližně uprostřed kontrolní oblasti. Označení nukleotidů vzrůstá ve směru

5'→3' lehkého řetězce a poslední pozicí je díky kruhovému tvaru vedle pozice 1 — pozice 16569. Původní CRS byla v roce 1999 znovu osekvenována (Andrews et al, 1999) a došlo k opravení některých špatně určených pozic. Tato zrevidovaná sekvence se označuje rCRS a slouží jako standard, vůči kterému je analyzovaná mtDNA porovnávána.

### 5.2.3. Nomenklatura mutací mtDNA

Jak již bylo výše zmíněno, mezi nejčastější typ mutací patří delece, substituce, inserce či vznik SNP mutací. Pokud dojde k substituci, na určité pozici dojde k záměně nukleotidů. Například dle rCRS se na pozici 2341 vyskytuje cytozin. Pokud se ve zkoumané mtDNA na této pozici nachází jiný nukleotid, například guanin, záměna se zaznamená jako 2341G.

V případě, že substituce určité pozice a variantě (alele) vyskytuje v populaci s vyšší frekvencí než 1%, nazývá se tato mutace polymorfismem jedné pozice, nebo též SNP (single nucleotide polymorphism), který se řadí mezi sekvenční polymorfismy. Jelikož se SNPs nejčastěji vyskytují ve dvou možných variantách alel, jsou SNPs často označovány jakožto bi-alelické markery. Nová varianta může vzniknout transicí jakožto záměna za nukleotid s bází stejného derivátu, jako je záměna  $G \leftrightarrow A$  ( $C \leftrightarrow T$ ). Druhým typem je vznik SNP transverzí, kdy mutací dojde k náhradě nukleotidu bází jiného derivátu -  $T \leftrightarrow A$  ( $A \leftrightarrow T$ ),  $C \leftrightarrow G$  ( $G \leftrightarrow C$ ) či  $C \leftrightarrow A$  ( $G \leftrightarrow T$ ). Nejčastěji zastoupeným typem SNP je transice  $G \leftrightarrow A$  ( $C \leftrightarrow T$ ), což má souvislost s 5-metylcytosinovou deaminací (Brookes 1999).

V případě delece u zkoumané mtDNA chybí na určité pozici nukleotid, což se zaznamená jako 2341D, 2341- či 2341d. Inzerce je typem mutace, kdy dojde k vložení nukleotidu. V tomto případě se zaznamená pořadové číslo nukleotidu před zaznamenanou inzercí, toto číslo je odděleno tečkou a zapíše se pořadí nově vložených nukleotidů spolu s jejich písmenným kódem — np. 2341.1G.

### 5.2.4. Dědičnost mtDNA

Bylo prokázáno, že mitochondriální DNA je děděna po maternální linii (Giles et al, 1980). Při oplodnění vajíčka proniká do vnitřní části vajíčka pouze hlavička a střední část

spermie. Tyto části spermie, na rozdíl od ocásku, obsahují pouze minimální množství mitochondrií, mezi 50-75 kopiemi (Simons, Cummins, 1996). V porovnání vajíčko obsahuje přibližně 10000x více mitochondrií než pronikuvší část spermie (Simons, Cummins, 1996). V průběhu spermatogeneze dochází k označení parentální mtDNA ubiquitinem. V případě, že se do vajíčka dostane takto označená mtDNA, dochází k její selektivní likvidaci (Hershko, Ciechanover, 1998). Systém selektivního odstranění parentální mitochondriální DNA je velmi rychlý, takže již před prvním mitotickým dělením není možné parentální mtDNA detekovat.

Porovná-li se výskyt mutací v nDNA a mtDNA, je jejich výskyt mnohem častější v mtDNA. Toto je dáno především skutečností, že se mtDNA vyskytuje v radikálovém prostředí. Dále absencí histonů chránících mtDNA, nižší přesností mtDNA polymerázy než je přesnost polymerázy nDNA a s tím i souvisejícími nízkými reparačními mechanismy této polymerázy (Pinz, Bogenhagen, 1998). Mutační rychlost oblasti hypervariabilních úseků je 5-10 krát rychlejší než u nDNA (Budowle et al., 2003). Z tohoto důvodu se na hypervariabilní oblasti I a II se zaměřuje forenzní genetika, zejména sekvenací těchto oblastí.

Především vlastnosti jako jsou vysoký počet molekul mtDNA v buňce, maternální dědičnost a nízká četnost rekombinace umožňuje identifikaci pozůstatků osob, u kterých není možné použít identifikaci pomocí analýzy STR úseků. Identita pozůstatků se však dá stanovit pouze v případě, že je k dispozici mitotyp (sekvenci mtDNA) příbuzných po maternální linii — matky, sourozenců či jiných příbuzných této linie. V praxi bylo této analýzy užito například k určení objektů trosek WTC z 11. 9. 2001 či v hromadném hrobě rodiny zavražděného Cara Mikuláše II (Gill et al, 1994).

### **5.2.5. mtDNA haploskupiny**

Další oblastí studia je genetika lidských populací a evolučních studií, díky potvrzení souvislosti vzniku SNPs a geografickým původem. Oblastí zájmu jsou takzvané haploskupiny. Mitochondriální haploskupina je definována souborem určitých SNPs lokalizovaných na mtDNA, díky kterému je možné určit geografický původ.

Pro SNPs je charakteristická nízká mutační rychlost, která je přibližně  $10^{-8}$  na generaci a lokus, což přibližně znamená vznik jedné SNP mutace za 1500 let (Brookes, 1999). U tohoto typu mutací se jen zřídka vyskytuje zpětná mutace. Znamená to tedy, že v případě vzniku SNP mutace zůstává v genomu a je dále děděna z generace na generaci. Tím, jak se takovéto mutace kumulovaly v genomu určitých migrujících populací, v genomu populací vznikl a přetrval soubor SNPs, který následně definoval haploskupinu. Sledováním vhodně vybraných SNP je možné mtDNA analýzou populací sestavit takzvaný fylogenetický strom vzniku mutací, díky kterému je možné odvodit geografický původ (Stoneking, 1994)

Původní rozdělení do haploskupin se vztahovalo k pozici mtDNA, kam se vázal restriční enzym *HpaI*. Korelace mezi restriční pozicí lokalizovanou na mtDNA a geografickým původem bylo prokázáno na studii porovnávající africké kmeny Bantů, Pygmejů a Křováků. U všech bylo analyzováno stejné restriční místo, konkrétně na pozici 3592. U ostatních populací se toto restriční místo nenacházelo. Užitím dalších vhodných restričních enzymů byla lidská populace rozdělena na základě restričních pozice do hlavních afrických, asijských a evropských haploskupin (Wallace et al, 1999).

Od roku 2001 se přešlo k definování haploskupiny pomocí souboru SNPs lokalizovaných jak v kódující, tak kontrolní oblasti (Finnila et al, 2001). Haploskupiny byly uspořádány do takzvaného fylogenetického stromu, který umožňuje sledovat mateřskou linii od recentní populace až po „Mitochondriální Evu“ (označována jako mtMRCA — matrilineal most recent common ancestor), což je v mateřské linii společný předek všech dnes žijících lidí. Žena nesoucí tuto mtDNA žila přibližně před 200 000 lety, tedy po vzniku anatomicky moderního člověka a současně dlouho před vycestováním člověka mimo Afriku (Strauss, 1999).

Nejstarší a nejpůvodnější haploskupina lokalizuje původ svého vzniku do Afriky a je nazvána haploskupinou L. Dělí se na 4 hlavní subhaploskupiny, které jsou definovány velkým množstvím SNPs. Nejstarší větví je haploskupina L0, která se osamostatnila před 100 000 lety, lokalizuje se především v centrální a východní Africe. Haploskupina L1 je rozšířená zejména v centrální a jižní Africe, nejrozšířenější L2 haploskupina pak v centrální a západní Africe. Haploskupina L3 se nejčastěji vyskytuje v oblasti severní Afriky a právě štěpením této linie vznikly dvě linie, ze kterých vychází ostatní

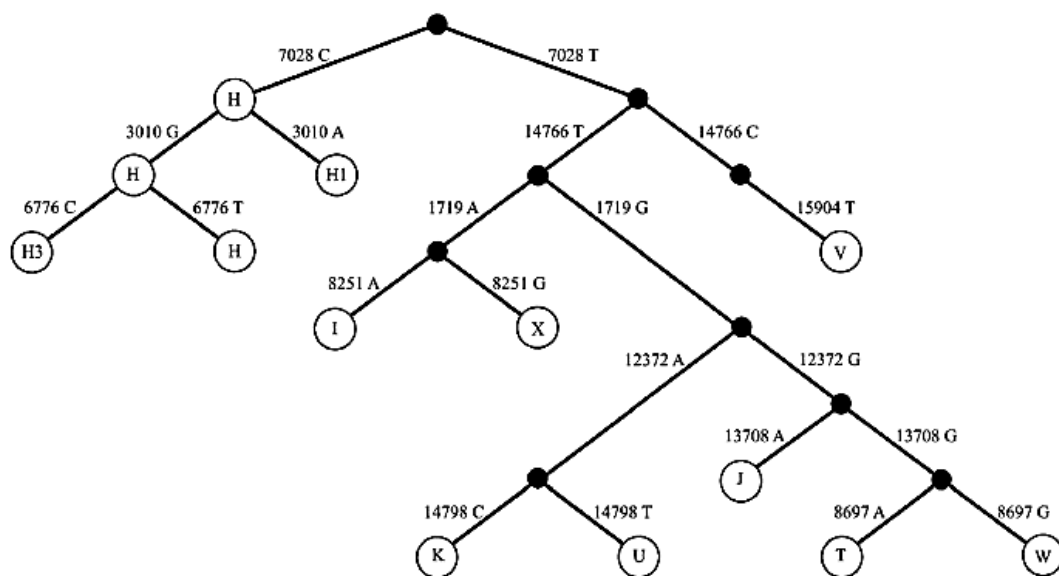


haploskupiny. Jedná se o haploskupinu M, která dala vzniknout všem asijským a americkým haploskupinám, a haploskupinu N, ze které jsou odvozeny evropské haploskupiny.

Z haploskupiny M jsou odvozeny skupiny A, B, C a D. K jejich odštěpování došlo v průběhu migrační vlny linoucí se skrz Asii a Sibiř (přibližně před 50 000 lety). Díky zamrzlé Beringově úžině byl umožněn migrační tah přes Aljašku do Severní a Jižní Ameriky, a to přibližně v období 20 — 15 000 lety. Pro asijskou populaci jsou dále charakteristické haploskupiny F, G, K a M. Jelikož byl Americký kontinent osidlován v několika vlnách, a to i z Evropy, je u původních obyvatel Ameriky detekována haploskupina X, která je původně evropskou haploskupinou.

Hlavní haploskupiny Evropy jsou odvozeny od haploskupiny N — jedná se o haploskupiny H, I, J, T, U, V, W, a X. Vznik těchto haploskupin se pojí s osidlováním Evropy, které bylo započato přibližně před 30 000 lety. Nejrozšířenější střeoevropskou haploskupinou je H, která je v populaci zastoupena v 45% (Brandstätter et al, 2003, Brandstätter et al, 2005, Köhnemann et al, 2009). Tato skupina je definována absencí mutace na pozici C7028T — nachází se zde tedy nukleotid dle rCRS, cytosin. Výskyt thyminu na této pozici značí, že vzorek spadá pod jinou evropskou haploskupinu — I, J, K T U, V, W nebo X. Nejčastěji zastoupenou subhaploskupinou linie H je subhaploskupina H1, která je definována mutační alelou SNP G3010A. Zastoupení této linie je přibližně 14,5%.

Haploskupina H má mnoho subhaploskupin, krom již uvedené H1 je to H2, H3, H4 či H5. Druhou nejčetnější haploskupinou je haploskupina U v zastoupení přibližně 18,8%, přičemž skupina je definována mutačními nukleotidy SNP C14766T a G12372A. Mezi další početné evropské haploskupiny řadíme haploskupinu T se zastoupením 13,2% či haploskupinu J zastoupenou v 9% (Brandstätter et al, 2003, Brandstätter et al, 2005, Köhnemann et al, 2009). V tabulce č. 1 je znázorněn kladogram evropských haploskupin spolu s nukleotidovými variantami SNPs, kterými jsou dané haploskupiny stanoveny.



Obrázek č. 2. Kladogram evropských haploskupin a nukleotidové varianty SNP, kterými jsou tyto haploskupiny stanoveny (převzato z Brandstätter et al, 2003).

## **6. MATERIÁL**

Pro tuto diplomovou práci byly použity především vzorky trichologických materiálů (více viz níže), které jsou používány ve forenzních případech jako zajištěné stopy. Protože se tato diplomová práce zabývá analýzou mtDNA trichologického materiálu, neobsahujícího nDNA, jako nejvýhodnější se jevílo využít stávajících metod a postupů forenzní laboratoře KUP a pokusit se je dále rozvinout.

Běžný postup laboratoře KUP při přijímání trichologického materiálu nalezeného na místě činu od kriminalistických techniků je ohledání tohoto nálezu na oddělení biologie (antropologická zkoumání) KUP. Trichologický materiál se standardně ohledává a analyzuje pomocí mikroskopu Olympus BX50 F-3, kde jsou vzorky pozorovány v procházejícím světle. Dle standartního postupu, v případě absence nDNA (vzorky trichologického materiálu v telofázi či v anafázi) se tento typu trichologického materiálu neprovádí. Takovéto vlasy se dále vyšetřují pouze v případě, že se jedná o závažný kriminální čin, opravňujícího zvýšené úsilí, či v případě omezeného množství důkazů.

Po konzultaci s RNDr. Dvořákem z biologické sekce oddělení KUP jsme se rozhodli pro sběr dvou skupin vzorků trichologického materiálu. První skupinou vzorků jsou sady trichologického materiálu v anafázi, kdy od každého jedince byly odebrány vzorky vlasů, axilárního ochlupení, pubického ochlupení a k porovnání vyizolované mtDNA též bukální stěr daného jedince. Druhou skupinou vzorků jsou sady vlasů v telofázi. Pro porovnání vyizolované mtDNA byl od každého jedince vždy odebrán i bukální stěr.

### **6.1. Sada trichologického materiálu v anafázi**

Ke sběru tohoto materiálu bylo využito celkem 12 dobrovolníků, z čehož 8 bylo žen a 4 mužů ve věku od 18 — 30 let, kteří neměli chemicky upravené vlasy. Vybraní jedinci nebyli v příbuzenském vztahu po maternální linii. Dobrovolníci byli obeznámeni s cíli diplomové práce a spolu s odevzdáním vzorků byl podepsán informovaný souhlas. Vzorky byly vedeny jako anonymní, uloženy pod číselným kódem spolu s označením, o jaký typ trichologického materiálu se jedná. Od každého dobrovolníka byla získána série vlasů, axilárního a pubického ochlupení o minimální délce 2 cm. Sběr ochlupení se prováděl

pomocí pinzety, která byla vždy očištěna 98% etanolem. Vzhledem k délce trichologického materiálu a plánovanou úpravou tohoto materiálu (dodatečné odstranění kořenové části spolu s pochvou folikulu obsahující jadernou DNA), byl trichologický materiál uložen na sběrné karty užívané KUP ke sběru a uchování stop. Každá z karet byla označena číselným kódem s písmenným označením typu trichologického materiálu (vl, ax, pub) spolu s označením pohlaví. Celá série jednoho jedince byla takto uchovávána vždy pohromadě v jedné obálce. Bukální stěr byl sejmut pomocí tamponu standardně užívaného k těmto účelům na KUP.

Příprava vzorků k izolaci probíhala v laboratoři, která je určená k manipulaci a izolaci DNA z materiálů obsahující malé množství DNA v tzv. LCN laboratoři. V laboratoři se vždy užívalo ochranných pomůcek — ochranný oděv, ochranná pokrývka hlavy, rouška a rukavice. Veškerý instrumentář, jako jsou nůžky či skalpel, byl vždy před kontaktem s novým vzorkem trichologického materiálu řádně očištěn 98% ethanolem. Po ukončení práce byla vždy standardně pracovní plocha desinfikována pomocí Incidur Spray. Pro odstranění DNA byl užit DNA Remover.

Před samotnou izolací mtDNA byl z každého vzorku odříznut úsek o délce 1 cm obsahující kořínek a obaly vlasového stvolu — tímto se odstranila část obsahující nDNA. K izolaci byl použit úsek navazující na odříznuvší část, a to o délce 3 cm. Pokud dodané vzorky byly kratší než 3 cm, byl přidán další vlas ošetřený stejným způsobem tak, aby celková délka trichologického materiálu ve zkumavce byla 3 cm. K vyříznutí požadované části vlasu byl užit skalpel. Odříznutý vlas a chlup byl propláchnut pod proudem 98% etanolu a uložen do 1,5 ml zkumavky. Propláchnutí etanolem jsme zvolili především proto, aby se odstranila eventuelní přítomnost zbytku gelu ze sběrných karet a možnou kontaminaci cizorodou DNA. Pro lepší rozklad a izolaci mtDNA z vlasu jsme ve zkumavce trichologický materiál rozstříhali na co možná nejkratší úseky tak, aby veškerý materiál mohl být v průběhu izolace zcela ponořen v izolačním roztoku. Každá zkumavka byla označena příslušným číselným kódem a označením, o jaký typ trichologického materiálu se jedná. Po uložení trichologického materiálu do zkumavek následovala izolace mtDNA.



*Obrázek 3. Vlas v anagenní fázi, zvětšení 100x, foceno na mikroskopu Olympus BX50 F-3. Na snímku je patrná měkká část kořínku. Nad kořínkem je dobře patrný tmavý proužek, což je tzv. keratinizační zóna, ve které probíhá keratinizace vlasu. Foto autor.*

## **6.2. Sada trichologického materiálu v telofázi**

Ke sběru vlasů v telofázi bylo využito 17 dobrovolníků, 10 žen a 7 mužů ve věku od 18 do 30 let. Dárci (donoři) trichologického materiálu byli vybráni dle stejných podmínek jako dárce trichologického materiálu v anafázi. Jelikož jsme se rozhodli pro zařazení tohoto typu vlasu až v průběhu studie, dárce vlasů se neshodují s dárce trichologického materiálu v anagenní fázi.

Od každého jedince bylo odebráno několik vzorků vlasů. Jelikož se jedná o vlasy v telofázi, čili typ vlasů vypadávající samovolně, sběr probíhal tak, že dobrovolník se předklonil a jemně si pročísl vlasy nad obálkou. Buď byly vlasy zachyceny v obálce, popřípadě byly sejmuty uchycené vlasy na rukou. Zalepená obálka s vlasy byla označena číselným kódem spolu s označením pohlaví. Dobrovolníkům byl též odebrán bukální stěr tamponem k tomu určeným. Samotný výběr vhodných vlasů v telofázi byl proveden v laboratoři antropologické sekce KUP pomocí mikroskopu.

Odebrané vlasy byly umístěny na podložním sklíčku, které bylo očištěno v 98% roztoku etanolu, imobilizovány pomocí dH<sub>2</sub>O a zafixovány krycím sklíčkem. K analýze vlasů jsme použili mikroskop Olympus BX50 F — 3, k analýze se využívá procházející světlo. Vzorky vlasů jsme prohlíželi na objektivu zvětšující 4x a 10x. Jelikož užitý okulár má zvětšení 10x, celkové zvětšení vzorků bylo 40x — 100x. Vybrané vlasy v telofázi byly zkráceny na délku přibližně 3 cm (včetně kořínku) a uloženy do 1,5 ml zkumavky.

Po přenesení vzorků vlasů z oddělení antropologie do laboratoře LCN byl vlas vyjmut ze zkumavky a propláchnut 98% etanolem. Následně byl vlas uložen do 1,5 ml zkumavky, která byla označena číselným kódem a označením, o jaký typ materiálu se jedná. Materiál byl upraven stejným způsobem jako trichologické vzorky v anafázi. Tímto byly vzorky připraveny k izolaci mtDNA.



*Obrázek 4. Snímek vlasu v telofázi, pořízen na mikroskopu Olympus BX50 F-3, zvětšení 100x. Foto autor.*

### **6.3. Sada bukálních stěrů užitá k optimalizaci vybraných primerů**

K optimalizaci užitých primerů a ověření jejich funkčnosti bylo kromě bukálních stěrů získaných spolu s trichologickým materiálem užito bukálních stěrů od 14ti dárců, z čehož bylo 5 žen a 9 mužů ve věku od 18 — 30 let. Dárci bukálních stěrů byli vybráni dle stejných parametrů jako dárci trichologického materiálu. Manipulace s těmito bukálními stěry probíhala stejným způsobem jako u bukálních stěrů darovaných se vzorky trichologického materiálu.

## **7. METODY**

Cílem této kapitoly je představení všech metod užitých v této práci. Na úvod podkapitoly je vždy uveden teoretický základ metody s užitým protokolem či postupem.

### **7.1. Izolace DNA**

Izolace je prvním krokem forenzní analýzy DNA. Úspěšnost a výtěžnost této metody odráží další možnosti analýzy. K izolaci DNA z trichologického materiálu i bukálního stěru jsme užili standardně užívaných postupů na KUP.

Především při izolaci DNA z trichologického materiálu je zapotřebí mít na paměti, že izolací DNA je trichologický materiál spotřebován a není již možná další antropologická analýza. Proto je třeba k této analýze přistoupit až po morfoskopickém prozkoumání vzorku či dostatečném množství vzorku pro oba typy analýz.

#### **7.1.1. Izolace DNA z trichologického materiálu**

K izolaci mtDNA ze všech typů testovaného trichologického materiálu (vlasů, ochlupení v oblasti podpaží a třísel) bylo užito izolační sady Tissue and Hair Extraction Kit, kdy se tato sada užívá spolu s izolačním kitem DNA IQ. Tissue and Hair Extraction Kit umožňuje rozrušení odolných keratinizovaných buněk stvolu trichologického materiálu spolu s degradací a vymytí proteinů. Vazba molekul DNA (jaderné i mitochondriální) je umožněna paramagnetickou suspenzí, která je součástí kitu DNA IQ. Úseky kratší 80 párů bází velmi často inhibují proces PCR. Takto krátkým úsekům je znemožněno se na paramagnetickou suspenzi navázat a jsou s ostatním negenetickým materiálem vymyty. Zároveň je tento izolační kit schopen odstranit vlasový pigment, který by jinak mohl inhibovat reakci PCR.

Při izolaci trichologického materiálu jsme postupovali dle protokolů uvedeným výrobcem. Do zkumavky s vlasem či ochlupením jsme přidali 100 µl čerstvě připraveného inkubačního pufru. Tuto směs je nutné vždy před užitím připravit čerstvou z reagensů v poměru:



Incubation buffer	800 $\mu$ l
1 M DTT	100 $\mu$ l
PK	100 $\mu$ l

Po přidání inkubačního pufru do zkumavky s vlasy jsme směs zamíchali a nechali inkubovat na vyhřívané třepačce při 56°C po dobu 1 h. Po inkubaci jsme vzorky umístili do stojánku a přidali 200  $\mu$ l Lysin Buffer (lyzační pufr) spolu se 7  $\mu$ l resuspendované paramagnetické suspenze. Směs byla řádně promíchána na rotační třepačce a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.

Po inkubaci následovalo promíchání na rotační třepačce a vzorky jsme umístili do magnetického stojánku. Následně jsme opatrně odpipetovali roztok ze dna zkumavky (paramagnetické kuličky s navázanou DNA byly díky magnetickým silám poutány na stěně ependorfy). Do zkumavky bylo přidáno 100  $\mu$ l lyzačního pufru. Po promíchání vzorku na rotační třepačce byl vzorek umístěn do magnetického stojánku a byl odstraněn roztok lyzačního pufru. Do zkumavky bylo přidáno 100  $\mu$ l Wash Buffer (promývací pufr), po promíchání na rotační třepačce byla zkumavka vrácena zpět do magnetického stojánku a roztok byl opatrně odstraněn.

Krok promytí paramagnetických kuliček roztokem lyzačního a promývacího pufru byl proveden ještě dvakrát. Při posledním promytí roztokem promývacího pufru je důležité odebrat maximum roztoku a nechat paramagnetické kuličky vyschnout při otevřeném víčku zkumavky při laboratorní teplotě, neboť další přítomnost tohoto roztoku v reakci by kolidovala působení dalších chemikálií. Doporučená doba schnutí je 5 — 10 minut. Výrobce nedoporučuje přesáhnout dobu schnutí 20 minut, jelikož by to mohlo negativně ovlivnit uvolnění DNA z paramagnetických částic. Do zkumavky jsme napipetovali 30  $\mu$ l Elution Buffer (uvolňovací pufr), řádně promíchali na rotační třepačce po dobu 5 s a inkubovali ve vyhřívané třepačce po dobu 5ti minut při 65°C. Po promíchání byly vzorky umístěny do magnetického stojánku. Následně se DNA uvolnila z paramagnetických kuliček do roztoku uvolňovacího pufru a roztok se opatrně přenesl do finálních zkumavek.

### 7.1.2. Izolace DNA z bukálních stěrů

K izolaci DNA z bukálních stěrů bylo užito suspenze pryskyřice Chelex 100 (podle Walsh et al., 1991), což je metoda standardně užívaná ve forenzní genetice k izolaci DNA ze vzorků obsahující vysoké množství DNA, jako jsou bukální stěr či stopy krve.

Chelex je pryskyřice na bázi polymeru, která je schopna za alkalických podmínek vázat dvojmocné ionty kovů, jako například  $Mg^{2+}$ . Chelatace právě těchto iontů způsobuje inaktivaci nukleáz (např. DNázu), což zamezuje degradaci separované DNA. Principem metody je homogenizace, destrukce a degradace buněčných membrán a proteinů spolu s denaturací DNA a jejím následným uvolněním do roztoku suspenze. Chelex je díky svým vlastnostem inhibítozem amplifikační reakce, a proto je nezbytné vyloučit přítomnost pryskyřice v reakcích a analýzách navazujících na izolaci DNA.

Izolace DNA bukálních stěrů byla provedena v laboratoři určené k izolaci DNA materiálů obsahujících vysoké množství kopií dědičné informace, v takzvané HCN laboratoři.

Nejprve byl tampon Dispolab s bukálním stěrem odměřen v 1 ml  $dH_2O$  po dobu 30 minut při laboratorní teplotě, zkumavka s tamponem byla průběžně promíchávána. Následně jsme tampon opatrně vyjmuli a zkumavku s lyzátem buněk centrifugovali na centrifuze po dobu 3 minut při rychlosti 13 000 rpm a následně jsme opatrně odsáli supernatant. Toto je nutné provést tak, aniž by byla odsáta peleta (tj. sediment na dně po centrifugaci). Do zkumavky jsme přidali 4  $\mu$ l proteinázy K a 200  $\mu$ l 5% suspenze Chelex 100. Tato směs byla inkubována na vyhřívané třepačce při teplotě 56°C po dobu 30 minut, poté jsme DNA denaturovali při teplotě 98°C po dobu 8 minut. Na závěr byla směs centrifugována při rychlosti 13 000 rpm po dobu 1 min, díky čemuž došlo k uvolnění DNA do supernatantu.

## 7.2. Kvantifikace DNA

Dalším krokem následujícím po izolaci DNA je jeho kvantifikace, neboli zjištění množství DNA v izolátu. Tento krok je důležitým pro ověření účinnosti izolační metody a je též důležitý pro další body analýzy — především pro PCR.

Nejčastěji užívanou kvantifikační metodou je v dnešní době RT-qPCR. Při této metodě dochází ke snímání fluorescence v průběhu amplifikace DNA, a to v reálném čase (Higuchi et al., 1992) s využitím fluorescenčního barviva (SYBR® Green) či TaqMan sondy.

Pro RT-qPCR proces je charakteristická křivka reakce, kterou lze rozdělit na tři oblasti — oblast exponenciální fáze, dále lineární fázi a fázi plató, kde již nedochází k amplifikaci vzorku díky vyčerpání některé z reagensů. Důležitým údajem pro zhodnocení počátečního množství DNA v izolátu je tzv. Ct hodnota, což je bod, kdy došlo k zaznamenání míry fluorescence nad určitou hranici (threshold). Čím je počáteční množství DNA v izolátu větší, tím dříve dojde k detekci fluorescence. Ct hodnota vzorku je pak porovnána s Ct hodnotou standardu o známé koncentraci DNA, díky čemuž je možné stanovit množství DNA ve vzorku.

Jelikož se na KUP nevyužívá ke kvantifikaci žádný komerčně (ani pro vědecké účely) vytvořený kit stanovující kvantitu mtDNA v izolátu (spolu se standardizovaným vzorkem o známém obsahu mtDNA, podle kterého by bylo možné kvantitu separované mtDNA porovnat a tím i určit množství vyizolované genetické informace), kvantifikace mtDNA prováděna nebyla. U bukálních stěrů byla prováděna kvantifikace nDNA standardně užívaným komerčním kitem. U izolátu DNA vzorků trichologického materiálu kvantifikace standardně prováděna nebyla z důvodu absence nDNA v tomto typu vzorků. Protože se předpokládá úměra mezi množstvím nDNA a mtDNA v izolátu, užili jsme údaje z kvantifikace především proto, aby do další reakce bylo užito u všech vzorků přibližně stejné množství mtDNA podle údajů o kvantitě nDNA v izolátu.

Protože se v dalších krocích (amplifikace pomocí PCR, analýza amplifikátu metodou HRM a sekvenací úseku mtDNA) užívalo primerů, které se váží přímo na mtDNA, bylo možné

analyzovat průběh amplifikace i přibližnou Ct, díky čemuž je možné zhodnotit, do jaké míry byla izolace mtDNA ze vzorků úspěšná.

### **7.2.1.Kvantifikace nDNA bukálních stěrů**

Ke kvantifikaci nDNA bylo užito komerčního kitu Quantifiler Human, v němž se genetické sondy specificky vážou na sekvenci pátého chromozomu, sekvenční 5p15.33, délka amplifikované sekvenční byla 62 bp. Kvantifikace probíhá za užití TaqMan sondy, což je oligonukleotid označený na svém 5'konci fluorescenčním barvivem (reporter). Na 3'konci se nachází tzv. zhášec fluorescence, který svojí přítomností brání molekule reporter emitovat fluorescenční záření. Sonda TaqMan se váže do úseku mezi dvojicí primerů, určující amplifikovanou oblast. Jakmile polymeráza amplifikující daný úsek dojde na 5'konec sondy s navázaným reporterem, tak odštěpí fluorescenčně označený konec sondy. Uvolnění reporteru se projeví detekcí fluorescenčního záření.

V kvantifikační reakci bylo vždy užito 10,5 µl Primer Mix, 12,5 µl PCR Reaction Mix a 2 µl vzorku, přičemž každý vzorek byl připravován v dvojici (dubletu). Vzorky byly kvantifikovány v 96 jamkové destičce, které byly překryty speciální fólií. Kvantifikace a analýza vzorků proběhla na LightCycleru.

## **7.3. Amplifikace pomocí PCR**

PCR neboli „Polimerase chain reaction“ je biochemickou reakcí, kdy amplifikací několika málo kopií DNA může vzniknout tisíce až miliony kopií určité sekvenční DNA za pomoci DNA polymerázy. Aby polymeráza mohla úsek našeho zájmu namnožit, musí být daný úsek ohraničen párem primerů (oligonukleotidů), na které může polymeráza nasednout a úseky prodloužit.

Tato metoda je založena na cyklickém opakování změn teplot, kdy dochází k opakovanému ohřevu a ochlazení reakční směsi. PCR je prováděna na přístroji zvaném termocycler, kde jsou vzorky uloženy v kovové destičce, která dle nastaveného protokolu zahřívá a ochlazuje vzorky o několik desítek stupňů v průběhu několika málo sekund.

Na počátku cyklu dochází k rapidnímu vzrůstu teplot, díky kterému dochází k denuraci DNA neboli oddělení řetězců. Takto oddělené řetězce poslouží jakožto templáty pro syntézu nových řetězců. Pokles teploty umožní nasednutí páru primerů, díky kterým může enzym — polymeráza nasednout na templát. Třetím krokem je pak zvýšení teploty na optimum, při kterém polymeráza nejlépe funguje.

PCR reakční směs se skládá z několika komponent. Každá z použitých reagensí musí být přítomna v optimálním množství a koncentraci. Nejdůležitější složkou, která umožňuje analyzovat úsek DNA našeho zájmu, je pár primerů. Primery jsou krátkými oligonukleotidy, které ohraničují úsek DNA, který má být amplifikován. Pro správné fungování PCR reakce je nezbytné správné stanovení jejich koncentrace v reakci — tomuto tématu se budu blíže věnovat v podkapitole optimalizace primerů.

Další důležitou součástí reakce je DNA polymeráza, která zajišťuje průběh amplifikace. Jelikož část reakce probíhá za denaturačních teplot, je nezbytné užití termostabilní DNA polymerázy, která by sama nedenaturovala při teplotě blízké bodu varu. Pro správný chod DNA polymerázy je nutné dodat optimální množství hořčíku a stavební jednotky — nukleotidy, ze kterých DNA polymeráza nasyntetizuje kopie nových řetězců DNA. V komerčním kitu je často směs DNA polymerázy, hořčíku a všech typů nukleotidů označována jakožto „Master Mix“, ve kterém je předem připravena směs těchto reagensí v optimálních koncentracích.

Aby reakce proběhla optimálně, je zapotřebí do reakce přidat přiměřené množství DNA. Jako optimální množství DNA je standardně užíváno 1 ng DNA (Edson et al., 2004), což je přibližně jaderná genetická informace 167 diploidních buněk. Při tomto množství by nemělo dojít k inhibici reakce PCR způsobené nadměrným množstvím DNA. Jaké množství vzorku izolátu DNA má být užito (popřípadě jakým způsobem izolát zředit), aby reakce PCR běžela optimálně, se zjistí z výsledků kvantifikace vzorků.

Spolu se sadou vzorků je též nutné amplifikovat tzv. negativní kontrolu neboli blank. Negativní kontrola obsahuje všechny použité reagensie, ale bez přidané DNA, místo vzorku se přidá dH<sub>2</sub>O. Blank slouží ke kontrole čistoty chemikálií a vyloučení

kontaminace. Standardně se užívá i pozitivní kontrola, což je komerčně vyráběná DNA známé sekvence a koncentrace, díky které je možné ověřit správnost proběhnutí PCR.

Jak již bylo uvedeno, PCR je založeno na cyklicky se opakujících změnách teplot, přičemž se každý z cyklů skládá ze tří kroků. Počet cyklů u amplifikace nDNA se nastavuje na 30 cyklů, při amplifikaci mtDNA se obvykle nastavuje 34 — 38 cyklů (Gabriel et al, 2003). Vzhledem k tomu, že jsme především u izolátů mtDNA z trichologického materiálu v telofázi očekávali velmi malé množství genetického materiálu, počet cyklů byl nastaven na 42 (Gabriel et al, 2003). Vyšší množství se však již nedoporučuje, především z důvodu možného výskytu artefaktů, nespecifických produktů či poklesu účinnosti PCR.

#### Cyklus PCR:

- Denaturace zahříváním směsi po dobu 20 — 30 sekund při teplotě 94°C — 98°C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových vazeb spojující řetězec DNA, díky čemuž dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA. Takto oddělená vlákna jsou připravena k nasednutí primerů.
- Annealing — nasednutí primerů. V tomto kroku dochází ke snížení teploty na 50°C — 65°C. Takovéto snížení teploty umožní nasednutí primerů na specifické úseky DNA, přičemž specifita nasednutí primerů je dána sekvencí užitých primerů. Pro většinu primerů je též specifické teplotní optimum, při kterém nasedají na komplementární úsek DNA. Na takto připravené primery se poté může navázat DNA polymeráza, která může začít prodlužovat řetězec DNA.
- Elongace — fáze syntézy DNA vlákna. Na správně navázané primery může nasednout DNA polymeráza, která syntetizuje nové vlákno DNA. Optimální teplota se v této fázi odvíjí od užití DNA polymerázy, u nejběžněji užívané Taq polymerázy je toto teplotní optimum při 72°C. Syntéza nového vlákna probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci, přirůstající vlákno je komplementární k řetězci DNA, na kterém jsou navázány primery. Jinak řečeno DNA polymeráza prodlouží nasednuté primery od jejich 3' konce dle templátu.

Jedním z nejdůležitějších předpokladů úspěšné PCR zkoumaného úseku je správně navržený pár primerů. Aby reakce PCR probíhala co nejefektivněji a výsledek byl maximální, je nutné, aby použité primery byly specifické pro danou oblast amplifikace, měly přibližně stejnou teplotu nasedání či aby mezi sebou neinteragovaly za vzniku struktur „primer dimer“. Zároveň vybraný úsek, na který se primer váže, by neměl obsahovat pozice, které často mutují, jelikož špatné nasednutí primeru negativně ovlivňuje průběh amplifikace. Mezi další doporučení patří:

- délka primerů mezi 18 — 30 pb
- teplota tání v rozmezí mezi 55°C — 72°C
- poměr GC bází 40 — 60 %
- zamezení komplementarity v rámci jednoho primeru (zamezení tvorby struktury zvané „hairpin struktury“)
- rozdíl teplot tání páru primeru  $\leq 5^\circ\text{C}$

#### **7.4. Metoda High resolution melting**

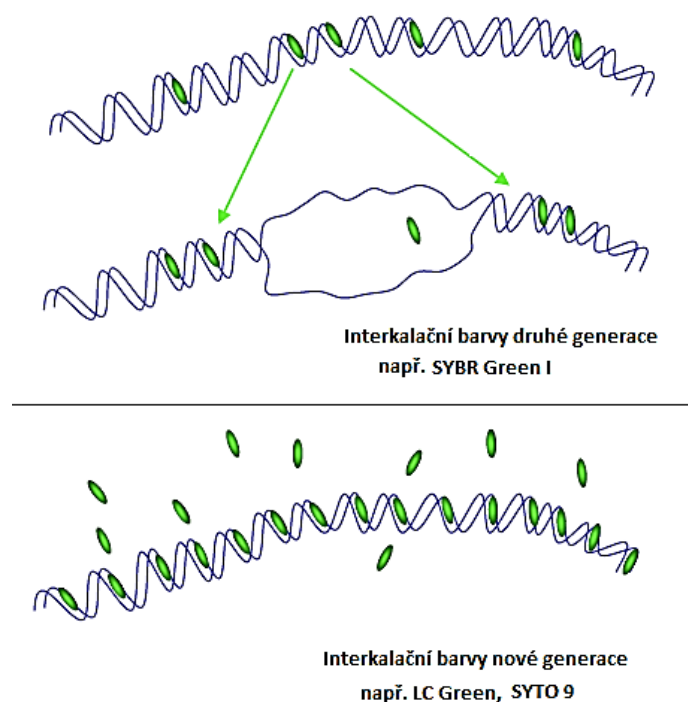
Analytická metoda High resolution melting (HRM) přímo navazuje na amplifikaci cílené sekvence DNA pomocí PCR (proto HRM analýzu řadíme mezi post-PCR metody). Tato metoda umožňuje detekovat mutace, polymorfismy či epigenetické rozdíly dvoušroubovice DNA. Principem analýzy je sledování průběhu disociace dvoušroubovicové DNA (ds DNA) v jednošroubovici DNA (ss DNA) v závislosti na teplotě.

Prvotní analýzy pomocí křivky tání byly publikovány již v roce 1997 (Ririe et al., 1997), k zobrazení průběhu disociace bylo použito fluorescenční barvivo SYBR Green I (interkalační činidlo, které se nespecificky váže pouze do vazeb ds DNA, řadí se mezi interkalační činidla druhé generace). Protože zvýšené množství SYBR Green I působí jako inhibitor PCR (Wittewer et al., 1997), bylo nezbytné před samotnou analýzou křivky tání doplnit vysoké množství tohoto interkalačního činidla do reakce (Lipsky et al., 2001). Jelikož jakákoliv manipulace či doplňování reagensů v průběhu reakce zvyšuje riziko vzniku nežádoucích mezireakcí a zvyšuje pravděpodobnost kontaminace, je obecnou

snahou vyvíjet tzv. closed-tube metody, při kterých v průběhu analýzy nedochází k žádným zásahům do reakce.

V první HRM closed-tube metodě bylo užito fluorescenčně označeného primeru (respektive jednoho z páru primerů) (Gundry et al, 2003). Nevýhodou této metody je nutnost užití fluorescenčně označeného primeru, neboť rapidně navyšuje cenu reakce. Díky uvedení tzv. nové generace interkalačních barev, byla vyvinuta metoda HRM mající dnešní podobu (Wittwer et al, 2003). Pro tyto interkalační barvy nové generace je charakteristická vysoká saturační schopnost, schopnost vymezení mezi všechny vazby ds DNA, aniž by užitá koncentrace inhibovala průběh PCR (zobrazeno v Obrázku č. 5). Díky plné saturaci vazeb nedochází v průběhu rozvolňování řetězců k přeskupování barviva a analýza je mnohem přesnější — což umožňuje zaznamenat i nejmenší rozdíl mezi řetězci, jako je jednobázový polymorfismus (SNP).





Obrázek č. 5. Porovnání vazby interkalační barvy druhé a nové generace. V horní části obrázku je zobrazena vazba interkalační barvy druhé generace (zde SYBR Green I) do ds DNA. Jelikož je nutné užít nižší koncentraci barviva, nemůže se navázat do všech vazeb ds DNA a tudíž při rozvonění řetězců (a tím i uvolnění interkalační barvy) dochází k redistribuci barvy do neobsazených vazeb dvouřetězce. Tato redistribuce významně ovlivňuje stanovení teploty tání amplifikátu. V dolní obrázku je zobrazena vazba interkalační barvy nové generace do vazeb ds DNA. Převzato z *HRM Assay Design and Analysis CorProtocol*

Téměř každá firma uvedla na trh „svoji“ novou interkalační barvu, jako Idaho Technology LCGreen<sup>®</sup>, Biotium Inc. EvaGreen<sup>™</sup>, Invitrogen barvu SYTO<sup>®</sup>9 či v této studii (tj. laboratoří KUP) používanou barvou LightCycler<sup>®</sup> 480 High Resolution Melting Dye od Roche.

Průběh reakce je kontinuálně zachycen optikou, která je schopná zaznamenat fluorescenční záření, díky specifickému interkalačnímu činidlu, které se váže pouze do vazeb ds DNA. Tím, jak se v dvoušroubovici DNA rozvolňují vazby mezi řetězci, dochází i k uvolňování interkalačního činidla, což se projevuje poklesem snímané fluorescence.

Křivka tání zobrazující průběh disociace DNA má tvar sigmoidy. Analýza teploty tání začíná při nízké teplotě, přibližně při 40°C, kdy veškerá DNA je ve formě dvoušroubovice. V této fázi jsou dvoušroubovice DNA plně saturovány, a proto je míra fluorescence na nejvyšší hodnotě. Spolu se zvyšováním teploty dochází k postupnému rozvolňování vazeb mezi DNA (a tím uvolňování fluorescenční barvy), což se projevuje poklesem měřené fluorescence. Oblast nejrychlejšího poklesu fluorescence se nazývá fází tání. Pokud se i nadále zvyšuje teplota, veškerá ds DNA disociuje v ss DNA, což má za následek vyvázání veškeré interkalační barvy z vazeb DNA — míra fluorescence je na nejnížší naměřené teplotě a přechází v plató. Naměřená křivka tání je pro další analýzu derivována, tedy křivka je převedena v první zápornou derivaci ( $-dF/dT$  je funkcí  $T$ ). Jelikož je teplota tání definována jako bod, ve kterém je polovina ds DNA rozvolněna v ss DNA, odpovídá tomuto bodu 50% hodnota fluorescence.

Teplota tání amplifikátu je především odrazem její délky a složením nukleotidů. Například, pokud se v řetězci bude vyskytovat jedna pozice SNP, kdy nukleotid G bude substituován za T, řetězec obsahující mutaci bude mít nižší teplotu tání z důvodu nižší stability dvojvazného T nukleotidu (a tím i nižší teploty rozštěpení vazeb). Vzorky obsahující homozygotní varianty alel budou mít paralelní průběh křivky teploty tání — pouze zde bude posunuta teplota tání amplifikátů. U heterozygotních vzorků je teplota tání nižší než u homozygotních vzorků — což je dáno nižší stabilitou duplexů. Křivka tání též většinou obsahuje dvě domény tání. V případě analýzy mtDNA se homozygotní a heterozygotní vzorky nerozlišují.

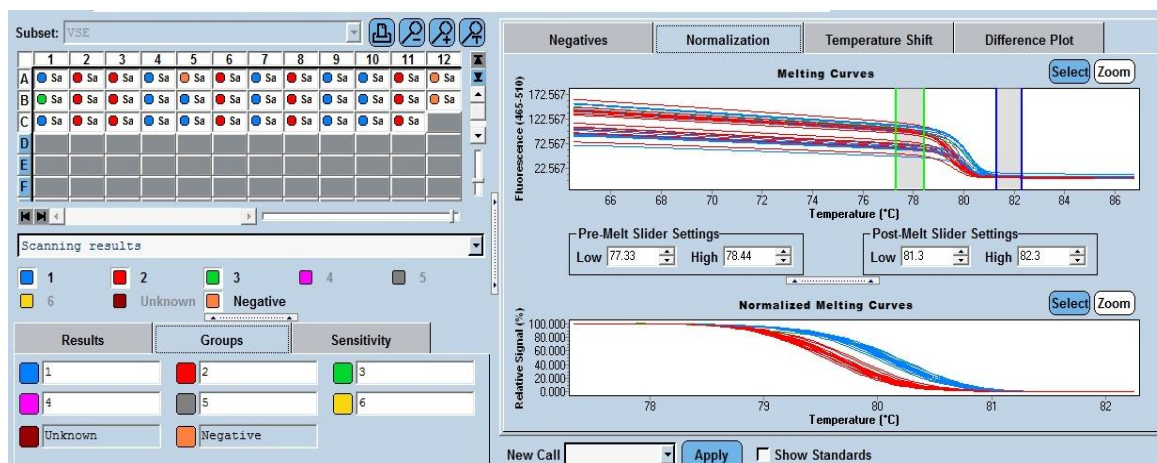
Doporučené nastavení běhu HRM:

- po PCR ihned následuje ochlazení směsi na 40°C, což zaručuje reasociaci všech ss DNA do dvouřetězců
- rámec teploty tání se odvíjí od průběhu tání produktů PCR. Pro počáteční nastavení se doporučuje interval mezi 60°C a 95°C. Poté, co dojde k optimalizaci, je možné tento interval snížit do rozmezí 25°C, přičemž snímání teploty tání musí začít minimálně 10°C před a skončit minimálně 5°C po předpokládané teplotě tání amplifikátů
- Aby přístroj mohl správně vyhodnotit teplotu tání, je nezbytné správné nastavení počtu snímání fluorescenčního signálu (acquisition) na 1°C. Nastavení doporučené

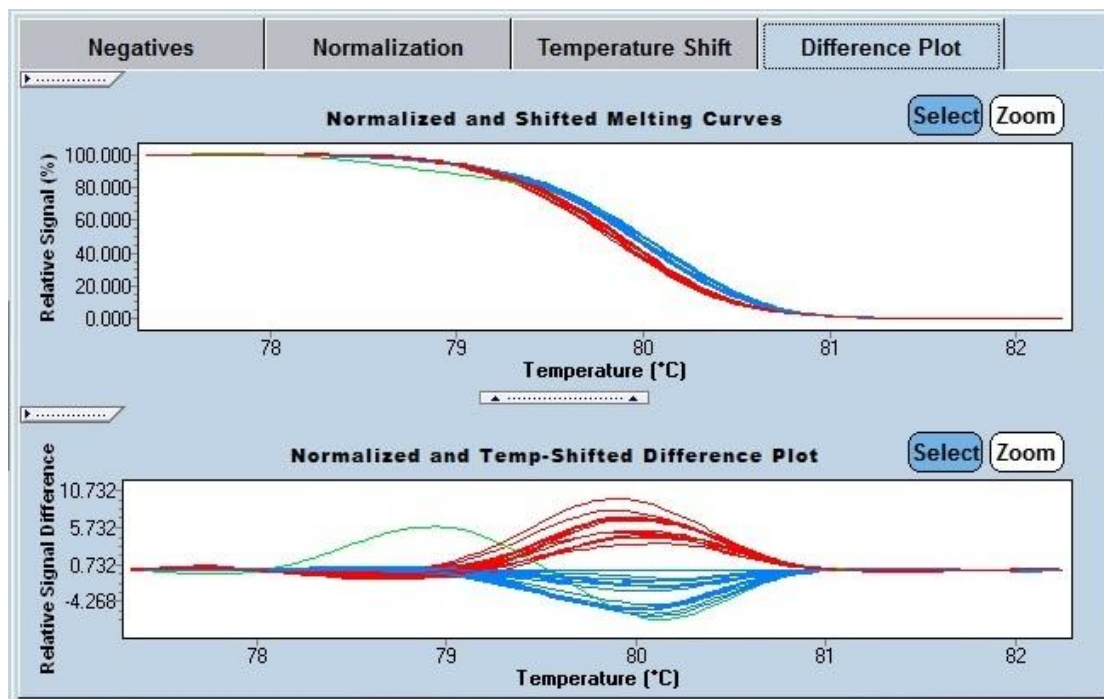
výrobce je 25 měření na 1°C a toto nastavení jsme v průběhu optimalizace neměnili.

Analýza HRM zkoumaných vzorků byla provedena na analyzačním softwaru LightCycler® 480 Software Release 1.5.0., v programu Gene Scanning a Tm calling.

Program LightCycler® 480 Gene Scanning Software je analyzačním programem přímo určeným ke zhodnocení výsledků analytické metody HRM. V prvním kroku analýzy provede program normalizaci hrubých dat za porovnání iniciační a finální fluorescence všech vzorků, tak aby křivky byly uniformní a mohly se dále porovnávat. V dalším kroku (temperature shift) program seřadí normalizované křivky podle bodu, ve kterém byly zcela denaturovány. Posledním krokem je převedení takto upravených dat v diferenční křivku (difference plot), kdy se vůči referenčnímu vzorku, respektive křivce tání (zde označena jako „base curve“), porovnává průběh tání ostatních vzorků. Díky tomu jsou vzorky rozděleny na základě svých křivek tání. Protože program srovnává vzorky vůči označeným standardům — v tomto případě vůči dvěma možným variantám nukleotidů dané SNP pozice (přičemž standardy mohou být součástí běhu, popřípadě uloženy externě), výsledkem analýzy je přiřazení označení varianty nukleotidu ke každému vzorku (Obrázek č. 6 a č. 7). Po optimalizaci tohoto softwaru je možné docílit rozlišení nukleotidových variant ve zkoumaném populačním vzorku.

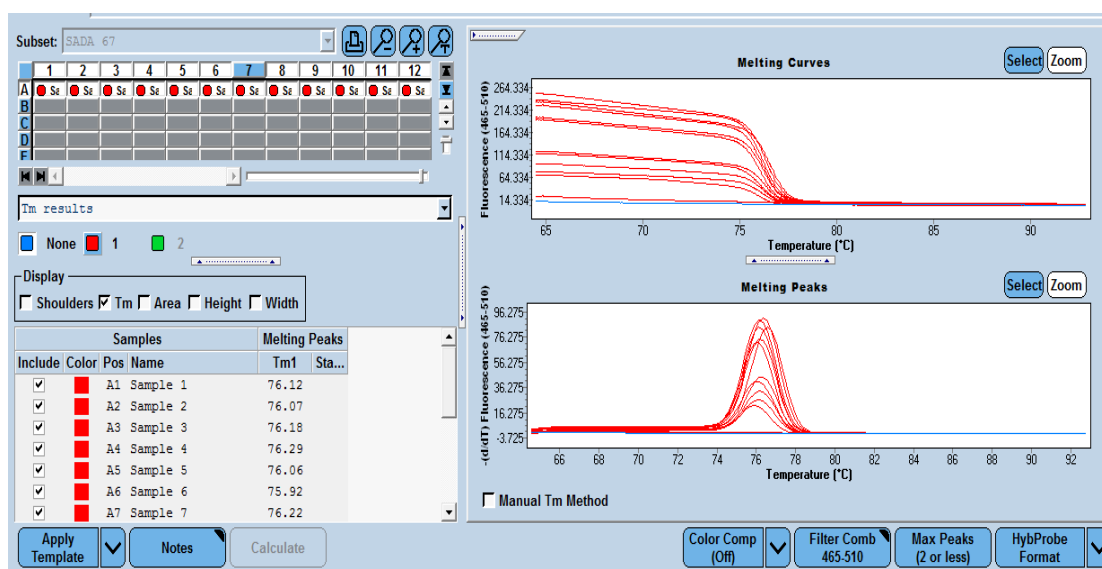


Obrázek č. 6. Analýza 11 vzorků izolátů bukálních stěrů pomocí primerů C7028T, v programu Gene scanning. V tabulce vzorků (v levé části obrázku) je v každém sloupci jeden vzorek, vždy analyzován v tripletu. V pravé horní části je zobrazen průběh tání amplifikátů vzorků, v dolní části normalizovaný průběh tání (bližší vysvětlení v podkapitole Metody). Vzorek A1 byl v této analýze označen jako standardní vzorek — nukleotid C (vzorky mající nukleotid C mají v grafu modrou barvu), vzorek A2 byl označen jako standardní vzorek — nukleotid T (vzorky obsahující nukleotid T na dané SNP pozici jsou označeny červenou barvou). Oranžovou barvou jsou označeny negativní vzorky. V přiloženém grafu je znázorněn průběh analýzy.



Obrázek č. 7. Konečné vyhodnocení výsledků je zobrazeno v diferenciačním grafu (navazuje na Obrázek č. 7), kdy vůči jednomu vybranému vzorku (v grafu se nachází uprostřed vzorků jakožto rovná čára, označovaná jako „base curve“) jsou porovnány vzorky ostatní v závislosti na rozdílu teploty tání.

Druhým programem, ve kterém probíhala analýza vzorků, je Tm calling. Analýza křivky tání zobrazuje pokles fluorescence na základě tání amplifikátů vzorků v průběhu zvyšující se teploty. Podle křivky tání je též softwarem vytvořen graf pro první zápornou derivaci křivky tání, ve kterém jsou teploty tání vzorků zobrazeny jako píky (Obrázek č. 8). Výsledkem analýzy pomocí tohoto programu je definování teploty tání.



Obrázek č. 8. Analýza vzorků v program Tm calling — na levé straně se nachází tabulka s označenými vzorky. V řádku se nachází sada izolátů mtDNA biologického materiálu od jednoho donora, konkrétně A1-3 izolát z bukálního stěru, A4-6 izolát vlasů v anafázi, A7-9 izolát z axilárního ochlupení, A10-12 izolát z pubického ochlupení. Spolu se vzorky se analyzoval negativní vzorek (v grafu označen modrou barvou). Pod souborem vzorků se nachází tabulka zobrazující teploty tání pro každý vzorek, na pravé straně jsou umístěny grafy zobrazující teplotu tání.

Teploty tání získané analýzou vzorků programem Tm calling, spolu s nukleotidovou variantou, byly zaznamenány. Výsledky byly následně vyhodnoceny ve statistickém programu R, verze 2.15.3.

## 7.5. Výběr SNP a příslušných primerů

Aby bylo možné v testované sérii vzorků zachytit obě alelické varianty vybraných SNPs, bylo nutné vybrat takové pozice polymorfismů, které se v populaci vyskytují v dostatečně vysoké míře. Z toho důvodu jsme se rozhodli pro takové SNPs, které stanovují nejčtenější evropské haploskupiny. Toto mělo zajistit detekovatelné množství variant alel v námi zkoumaných vzorcích. Bylo vybráno celkem 5 SNPs, které stanovují následující haploskupiny:

- A2706G — výskyt nukleotidu A zařazuje vzorek do haploskupiny H
- C7028T — detekce nukleotidu C na této pozici zařazuje vzorek do haploskupiny H. Pro úspěšné zařazení do haploskupiny H je postačující úspěšná detekce jedné z těchto výše uvedených dvou pozic.
- G3010A — substituční nukleotid A zařazuje vzorek do subhaploskupiny H1. Zařazení do subhaploskupiny je podmíněno výskytem nukleotidu C na SNP C7028T nebo nukleotidu A na SNP A2706G.
- G12372A — mutovaná alela A řadí vzorek do haploskupiny U. To je podmíněno současným výskytem nukleotidu T na SNP C7028T spolu s nukleotidem T na SNP C14766T.
- C14766T — mutovaná alela T řadí vzorek do haploskupiny U. Za současného výskytu nukleotidu T na SNP C7028T a nukleotidu A na SNP G12372A.

Haploskupiny a příslušné SNP jsou blíže popsány v kapitole Úvod, Haploskupiny.

Studie, ze kterých jsme čerpali příslušné pozice (a v první sérii testování byly též převzaty sekvence primerů), byly provedeny na souborech s velkým počtem jedinců. Např. 2214 jedinců (Brandstätter et al., 2009). Předpokládali jsme tedy relevantní výskyt obou alel pro každou z SNP i v námi testovaném souboru vzorků.

V první sérii testovaných primerů jsme se rozhodli převzít již ověřené primery z publikací Brandstätter, Parson and Parson (2003) a Niederstätter and Parson (2009). Ačkoliv byly tyto primery užity pro analýzu pozic jinou metodou (SNaPshot), jeví se jako vhodné k amplifikaci a analýze metodou HRM (viz Tabulka č. 2).

SNP pozice	původní / mutovaný nukleotid	primer forward a reverse	citace
A2706G	A / G	GTGAAGAGGCGGGCCTG TGCTCTTCTGGGATACCTCGAAA	Niederstaetter - Parson, 2009
G3010A	G / A	CGACCTCGATGTTGGATCAGGACA CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	Brandstaetter, Parson — Parson, 2003
C7028T	C / T	GCAAACCTCATCACTAGACATCGTACTACACGACA CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	Brandstaetter, Parson — Parson, 2003
G12372A	G / A	TGCAACTCCAAATAAAAGGTAATAACCATGCACA GGGTTAACGAGGGTGGTAAGGATGGG	Brandstaetter, Parson — Parson, 2003
C14766T	C / T	ATCGTTGTATTTCAACTACAAGAACACCAATGACC GTGGGGAGGTCGATGAGTGAGTGGTTA	Brandstaetter, Parson — Parson, 2003

*Tabulka č. 2. Přehled převzatých primerů k vybraným SNPs.*

Jelikož se amplifikační reakce těchto převzatých primerů nepodařilo optimalizovat (blíže v kapitole Výsledky), byla navržena série nových primerů k vybraným SNP pozicím. Primery byly navrženy v programu Primer3 (v 0.4.0.), dle výše uvedených doporučení designu primerů. Samotné primery byly připraveny firmou TIB<sup>®</sup> MolBiol. Aby bylo možné amplifikáty analyzovat metodou HRM (viz dále), navržené primery navíc splňovali krom výše uvedených podmínek (kapitola 7.3):

- celková délka produktu amplifikace menší než 100 pb
- amplifikát neobsahuje další polymorfní místo, které by mohlo ovlivnit teplotu tání amplifikátu a tím i stanovení nukleotidové varianty na námi vybrané SNP pozici (viz dále)

Sekvence navržených primerů jsou uvedeny v Tabulce č. 3.



SNP pozice	původní / mutovaný nukleotid	primer forward a reverse
A2706G	A / G	AAATTGACCTGCCCCGTGAA TCCATAGGGTCTTCTCGTCTT
G3010A	G / A	TAGAGTCCATATCAACAATAG TGAACAAACGAACCTTTA
C7028T	C / T	CACTAGACATCGTACTACA CCTATGATGGCAAATACAG
G12372A	G / A	ACCATGCACACTACTATAACC TAACGAGGGTGGTAAGGATG
C14766T	C / T	CAACTACAAGAACACCAATGA GGAGGTCGATGAATGAGT

*Tabulka č. 3. Přehled navržených primerů k jednotlivým SNPs.*

### **7.5.1. Obecné schéma optimalizace průběhu amplifikace**

Před samotnou optimalizací bylo nutné každý z páru primerů rozředit, jelikož byly dodány výrobcem v lyofilizovaném stavu. Pro přípravu roztoku primerů jsme zvolili rozředění lyofilizovaných primerů v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  (jedno z doporučených ředění výrobcem) a z tohoto zásobního roztoku byl dále připravován čerstvý roztok primerů v koncentraci dle výsledku optimalizace každého z primerů. Každý z primerů byl testován rozředěním v ředící řadě 1:4, 1:2, 1:1 a jako neředěný primer. Zásobní roztok byl ředěn  $\text{dH}_2\text{O}$ . Výsledné ředění každého primeru je uvedeno v kapitole Výsledky.

Dalším bodem optimalizace průběhu amplifikace bylo zjištění optimální teploty nasedání primerů. Teplota nasedání primerů byla testována v rozmezí teplot od 55°C do 65°C. Optimální teplota každého z primerů je uvedena v kapitole Výsledky.

### 7.5.1.1. Optimalizační krok č. 1

Prvním krokem optimalizace amplifikace bylo zjištění optimální koncentrace a teploty nasedání všech pěti párů primerů. Každý pár primerů byl testován separátně. Destička, do které se pipetovala reakční směs, obsahuje 12 sloupců a 8 řad. Pro toto testování bylo využito termocycleru Verity za využití možnosti nastavení gradientu teplot od 55°C do 65°C, kde pro každé 2 sloupce byla nastavena jiná teplota nasedání primerů. Ředění primerů bylo testováno vždy po dvou řadách v ředící řadě 1:4, 1:2, 1:1 a dále byl testován neředěný primer (viz Obrázek č. 9 — Schéma rozdělení 96ti jamkové reakční destičky).

Každé ředění primerů pro každou teplotu tedy bylo testováno po čtyřech vzorcích za užití totožného vzorku DNA extrahovaného od jedné osoby. Pro správný průběh amplifikace je důležité optimální množství  $Mg^{2+}$  v reakční směsi (do reakce je pipetováno jakožto  $MgCl_2$  o koncentraci 25 mM). Jelikož v úvodní optimalizační reakci bylo možné zkoumat pouze dvě proměnné v reakci, bylo pipetováno 1,8  $\mu l$   $MgCl_2$  (což je předpokládané optimální množství). Po stanovení teploty annealingu a optimální koncentrace primerů bylo optimalizováno množství  $Mg^{2+}$  v reakci.

	55		57		59		61		63		65	
ředění primerů 1:4												
ředění primerů 1:2												
ředění primerů 1:1												N
neředěný primer												N

Obrázek 9. Schéma rozdělení 96ti jamkové destičky a rozdělení testovaných kombinací teplot tání a ředění primerů. Spolu se vzorky byly testovány 2 negativní vzorky (označeny písmenem N)

Vzorky byly připravovány do 96 jamkové reakční destičky určené do termocycleru Verity. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 10  $\mu l$  HRM Master Mix, 1  $\mu l$  forward a 1  $\mu l$  reverse primeru (ředění dle testovaného řádku), 1,8  $\mu l$   $MgCl_2$ , 5,2  $\mu l$   $dH_2O$  a 1  $\mu l$  izolátu DNA.

Nastavení teplotního profilu amplifikace na termocycleru Verity:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 42 cyklů:
  - denaturace 10 s, při 95°C
  - annealing 15 s, při nastavené teplotě (viz Obrázek č. 9)
  - amplifikace 20 s, při 72°C
- ochlazení a uchování vzorků: ∞ při 4°C

Protože termocycler Verity nemá speciální optiku snímající průběh reakce, bylo nutné provést analýzy vzorků metodou HRM na přístroji LightCycler. Tento přístroj analyzuje vzorky na jiném typu destičky, proto bylo nutné vzorky z původní destičky přepipetovat do destičky nové. Aby bylo zajištěno, že u všech vzorků bude analýza provedena ze stejného množství vzorků (rozdílné množství amplifikátů vzorků by mohl negativně ovlivnit výsledek analýzy), bylo po promíchání vzorků v destičce přeneseno 10 µl vzorků do destičky k analýze v přístroji LightCycler.

Nastavení teplotního profilu HRM na přístroji LightCycler:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- HRM reakce — 1 cyklus
  - 1 min při 95°C
  - 1 min při 40°C
  - 1 s při 65°C při nárůstu (Ramp Rate) 0,02°C/s
  - do 95°C, v průběhu nárůstu teploty kontinuální měření míry fluorescence (Acquisitions per °C) — 25x /1°C
- ochlazení a uchování vzorků: 10 min při 4°C

Analýza HRM zkoumaných vzorků byla provedena na softwaru LightCycler®480 Software Release 1.5.0., v programu T<sub>m</sub> calling. Ze všech kombinací teplot tání a koncentrace primerů byla vybrána taková kombinace, při kterých průběh tání amplifikátů dosahoval nejvyšší míry fluorescence v jednotkách RFU (poukazuje na vysoké množství vzniklého amplifikačního produktu), teploty tání čtyř vzorků byly téměř shodné a v průběhu amplifikace nevznikaly nespecifické produkty.

### 7.5.1.2. Optimalizační krok č. 2

Poté, co bylo prvním optimalizačním krokem vybrána optimální teplota a koncentrace primerů, bylo možné přistoupit k optimalizaci množství  $Mg^{2+}$  v reakční směsi. V reakci byla testována ředící řada od 1,4  $\mu$ l až 2,4  $\mu$ l  $MgCl_2$  (ředící řada vzrůstá po 0,2  $\mu$ l  $MgCl_2$ ) v celkovém reakčním objemu 20  $\mu$ l. K optimalizaci reakce byl použit identický izolát DNA jako při prvním optimalizačním kroku.

Již v tomto kroku byla stanovena optimální teplota annealingu daného SNP primeru, nebylo tedy nutné k amplifikaci produktů využívat cycleru Verity, ale pro amplifikaci a následný průběh HRM se užilo přístroje LightCycler.

Vzorky byly připravovány do 96 jamkové destičky. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 10  $\mu$ l HRM Master Mix, 1  $\mu$ l forward a 1  $\mu$ l reverse primeru (ředění dle optimalizace, viz kapitola Výsledky), 1  $\mu$ l izolátu DNA, množství testovaného  $MgCl_2$ . Reakce byla doplněna takovým množstvím  $dH_2O$ , aby celkový objem reakce byl 20  $\mu$ l.

Nastavení teplotního profilu amplifikace a HRM na přístroji LIGHTCYCLER 480:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 42 cyklů:
  - denaturace 10 s při 95°C
  - annealing 15 s při nastavené teplotě (v závislosti na výsledku Optimalizačního kroku č. 1)
  - amplifikace 20 s při 72°C
- HRM reakce, 1 cyklus
  - 1 min při 95°C
  - 1 min při 40°C
  - 1 s při 65°C při nárůstu (Ramp Rate) 0,02 °C/s
  - do 95°C, v průběhu nárůstu teploty kontinuální měření míry fluorescence (Acquistitions per °C) — 25x /°C
- ochlazení a uchování vzorků: 10 min při 4°C

Jako optimální množství  $MgCl_2$  bylo vyhodnoceno takové množství, při kterém průběh tání amplifikátů dosahoval nejvyšší míry fluorescence, píky zobrazující průběh tání opakovaně indikovaly shodnou teplotu tání a průběh reakce nevykazoval vznik nespecifických produktů. Finální množství  $MgCl_2$  optimální pro každý z SNP primerů je uvedeno v kapitole Výsledky.

### **7.5.1.3. Optimalizační krok č. 3**

Do optimalizace průběhu reakce bylo též zahrnuto testování vlivu snížené koncentrace vstupního materiálu do amplifikační reakce. Izolovaná DNA bukálního stěru jednoho z dárců byla nejprve kvantifikována. Na základě této kvantifikace byl roztok DNA rozředěn tak, aby se v 1  $\mu$ l vzorku nacházel 1 ng nDNA. Následně se připravila ředící řada, kdy zásobní roztok DNA byl zředěn 50x, 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 20 000x, 50 000x. Výsledné teploty tání pro každý z SNP primerů jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy — Tabulky č. 1, č. 3, č. 6.

Po zdárné optimalizaci průběhu amplifikační reakce a reakce HRM následovalo ověření na sérii vzorků, zda je možné pomocí vybraných primerů dle teploty tání rozlišit nukleotidovou variantu na dané pozici SNP. Po úspěšné optimalizaci amplifikace a HRM reakce každého SNP primeru proběhla analýza trichologického materiálu.

## **7.6. Sekvence mtDNA**

Metoda umožňující zjištění přesné pořadí nukleotidů v sekvenci DNA se nazývá sekvenace. Bylo vyvinuto několik metod umožňující sekvenaci DNA, nejčastěji užívanou metodou je tzv. Sangerova metoda sekvenování, původně opublikována v roce 1977 (Sanger et al., 1977).

Sekvenování pomocí Sangerovy metody funguje na podobném principu jako reakce PCR, zde je však navíc užito kromě deoxyribonukleotidových bází (dNTP) potřebných k prodloužení amplifikovaného řetězce DNA i setu tzv. terminačních

deoxyribonukleotidových bází (ddNTP), které růst amplifikovaného řetězce ukončují (Sanger et. al., 1977). Toto je způsobeno skutečností, že ddNTP neobsahují 3' hydroxylovou skupinu, jejíž přítomnost je nezbytná pro navázání dalšího nukleotidu. Absence této skupiny inhibuje další prodlužování řetězce DNA polymerázou a po zařazení ddNTP nukleotidu polymeráza ukončuje svoji činnost. Užitím vhodného poměru ddNTP a dNTP (např. 1:100), vzniká směs produktů různé délky, které se mezi sebou liší vždy o jeden nukleotid. Ve finálním kroku dochází k separaci fragmentů dle jejich délky, neboť jsou ddNTP fluorescenčně označeny a tak je možné stanovit pořadí sekvence vybraného úseku DNA.

Aby bylo možné přechist pořadí nukleotidu v dané sekvenci, přidává se do sekvenační reakce pouze jeden z páru primerů, ať již forward či reverse. Aby bylo možné rozlišit, který z ddNTP je navázán na každý z fragmentů, je každý typ ddNTP označen fluorescenční barvou. ddTTP (thymín) je označen červenou fluorescenční barvou, ddCTP (cytosin) modrou barvou, ddATP (adenin) červenou a ddGTP (guanin) je označen žlutou fluorescenční barvou. V dnešní době se k sekvenaci používá komerčně vyráběného sekvenačního kitu, který obsahuje směs všech typů dNTP a ddNTP v optimálním poměru.

Sekvence se skládá z následujících kroků:

- amplifikace vybraného úseku DNA s užitím obou primerů
- odstranění v reakci nespotebovaných dNTP a primerů — mechanickou separací za užití Microcon 100 či chemickou cestou užitím exonukleázy I
- stanovení kvantity amplifikovaného produktu
- asymetrická PCR amplifikace za užití 1 z páru primerů, spolu se směsí dNTP a ddNTP
- odstranění v reakci nespotebovaných primerů a směsi dNTP a ddNTP mechanickou či chemickou cestou
- analýza fragmentů

Analýza fragmentů a stanovení pořadí nukleotidů se v dnešní době standardně provádí na kapilární elektorforéze (CE). Principem této metody je separace fragmentů pomocí elektrického napětí, kdy fragmenty putují viskózním polymerem od záporně nabitých katod ke kladně nabitým anodám. Rychlost pohybu fragmentů je dána jejich délkou, přičemž kratší

fragmenty se pohybují polymerem rychleji než fragmenty delší, jejichž rychlost pohybu je snížena pórovitostí polymeru.

Mezi základní komponenty kapilární elektroforezy patří skleněná kapilára, dvě elektrody propojené elektrickým napětím a nádobky obsahující pufr. Blízko konce kapiláry je lokalizován laser a detektor fluorescence. Skleněná kapilára má délku je 25 — 75 cm o vnitřním průměru 50 — 100  $\mu\text{m}$ . Před samotným nasátím vzorku je do kapiláry nasáto příslušné množství polymeru. Následuje nasátí roztoku vzorku a průchod fragmentů kapilárou, kdy díky rozdílné délce dojde k rozdělení fragmentů dle jejich délky, respektive stejně dlouhé produkty se pohybují kapilárou stejnou rychlostí.

Samotná detekce fragmentů probíhá v detekční oblasti lokalizované při ústí kapiláry a analýza je umožněna detekcí emitovaného světla z fluorescenčně značených ddNTP. Po ozáření fragmentů pulzní vlnou z laseru dojde k emisi světla o určité vlnové délce. Tato emise je zachycena optikou (např. CCD kamerou), která zaznamená množství uvolněného světla. Výsledná sekvence je pak zaznamenána do formy elektroforetogramu.

### **7.6.1. Protokol sekvenace**

K sekvenaci mtDNA bylo užito standardně užívaného protokolu KUP. Jelikož nebylo z kapacitních důvodů možné osekvenovat pro každý prumer všechny analyzované vzorky, varianta nukleotidů daných SNP byla ověřována u následujících vzorků:

- vzorky s teplotou tání na dolní hranici teploty tání dané varianty SNP
- vzorky ve středním pásmu teploty tání dané nukleotidové varianty SNP
- vzorky v horní hranici teploty tání dané varianty SNP
- vzorky, jejichž teplota tání se nalézala v hraniční oblasti mezi předpokládanými teplotami tání dvou nukleotidů dané SNP

Sekvenací takto vybraných vzorků byly potvrzeny teplotní rozmezí pro obě varianty nukleotidu každého SNP. Dále sekvenace umožnila potvrdit vhodnost vybraného úseku k analýze mtDNA, jelikož bylo možné potvrdit, zda se v produktu amplifikovaných úseků

mtDNA objevují další pozice (kromě vybrané pozice SNP), kde by docházelo k mutaci a tím i ovlivnění teploty tání amplifikátů primerů (a tím i špatné interpretace výsledů).

#### **7.6.1.1. Amplifikace**

Prvním krokem sekvenace je amplifikace úseku mtDNA obsahující SNP příslušným párem primerů. Amplifikace probíhala na přístroji LighCycler a analýza průběhu amplifikace, respektive analýza HRM, posloužila jakožto kvantifikace. Dle míry fluorescence bylo dále stanoveno, jaké množství produktu bude v následujícím kroku užito k sekvenování. Stanovení správného množství je důležité, jelikož pokud je ve finální reakci užito příliš velké množství fragmentů, detekce a stanovení nukleotidu příslušné pozice je znemožněno příliš silným signálem.

Vzorky byly připravovány do bílé, 96 jamkové destičky. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 12,5 µl Master Mix, 1,5 µl forward primer (optimální koncentrace dle optimalizace PCR), 1,5 µl reverse primer (optimální koncentrace dle optimalizace PCR), 8,5 µl dH<sub>2</sub>O a 1 µl izolovaného vzorku.

Nastavení teplotního profilu na přístroji LightCycler:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 40 cyklů:
  - denaturace 15 s při 95°C
  - amplifikace 1 min při 60°C
- HRM (melting): od 50°C do 90°C
- ochlazení a uchování vzorků: ∞ při 4°C

#### **7.6.1.2. Purifikace amplifikátu I**

Po amplifikaci bylo nutné směs připravit na sekvenační reakci odstraněním všech reagensů, které nebyly spotřebovány v PCR reakci. Destička s produkty předchozího kroku byla nejprve po dobu 10 s protřepána na třepačce a dále centrifugována po dobu 2



min při 2000 rpm. V této fázi jsme napipetovali 5  $\mu$ l amplifikátu do předem připravené 1,5 ml zkumavky uložené na chladicím boxu. K amplifikátu jsme dále přidali 2  $\mu$ l ExoSAP-IT, který se v průběhu pipetování reagentie do zkumavky uchovával na chladicím boxu.

Při analýze výsledného elektroforetogramu byl zjištěn výskyt artefaktů způsobeného špatným přečištěním amplifikátu a nedostatečného odstranění primerů, které znemožňovaly osekvenování požadovaného úseku mtDNA. Z tohoto důvodu jsme původní protokol upravili následovně:

- Po smíchání amplifikátu a enzymatické směsi ExoSAP-IT jsme vzorky řádně promísili na třepačce a následně centrifugovali na příruční centrifuze tak, aby se roztok zcela přemístil na dno zkumavky. Protože má směs enzymů velkou hustotu a v průběhu aktivace enzymatické reakce nedochází ke střídání teplot (díky kterému se směsi reagentií v průběhu reakce promíchávají), pravděpodobně enzymatická reakce neproběhla optimálně. Jelikož promísení i centrifugace je nutné provést mimo chladicí blok (směs enzymů není možné až do spuštění reakce ponechat v chladu, což může mít nežádoucí vliv na enzymy), je nutné tyto kroky provést v co nejkratším možném čase.
- Původní nastavení průběhu enzymatické reakce bylo 15 min při 37°C následovaných deaktivací enzymů po dobu 30 min při 80°C. Aby bylo možné řádná degradace všech nenavázaných primerů a nespotřebovaných dNTP v průběhu reakce, byla enzymatická reakce prodloužena na dobu 30 min při 37°C.

Finální nastavení teplotního profilu na termocycleru GA9700:

- enzymatická reakce ExoSAP-IT: 15 min při 37°C
- deaktivace enzymatické směsi ExoSAP-IT: 15min při 80°C
- chlazení a uchování:  $\infty$  při teplotě 4°C

### 7.6.1.3. Sekvenační reakce

Po přečišťovací reakci následuje reakce sekvenační, často nazývaná jako asymetrická reakce. Aby bylo možné vyhodnotit jednotlivé nukleotidy přiřazené k pozicím sekvence, užívá se k sekvenaci pouze jednoho z párů nukleotidů. Při sekvenaci vzorku se vždy analyzuje vzorek v doubletu, kdy se ověřuje pořadí nukleotidů vzniklé z každého primeru zvlášť.

Reakční směs jsme připravovali do speciální 96ti jamkové destičky, kdy do každé jamky byl přidán 1  $\mu$ l sekvenačního kitu, 2  $\mu$ l sekvenačního pufru, 1  $\mu$ l jednoho z párů primerů (v optimální koncentraci) a směs dH<sub>2</sub>O a vzorku o objemu 6  $\mu$ l. Jaký poměr vody a vzorku bude užit, se odvozuje od výsledků amplifikační reakce. Sekvenační směs byla připravována do 96ti jamkové destičky, ve které sekvenační reakce proběhla v termocycleru a následně pak i proběhla sekvenační analýza.

Na kvalitě elektroforetogramu se velkou měrou podílí množství užitého amplifikátu. Pokud se v počátku sekvenační reakce nachází příliš veliké množství vstupního materiálu, výsledné množství analyzovaných fragmentů je příliš velké. Respektive výsledný signál emitovaný ddNTP skupinou fragmentů totožné délky (stanovující typ nukleotidu na dané pozici), je natolik silný, že analýza sekvence není možná.

Množství amplifikátu z první amplifikační reakce, kterou jsme užili do každé sekvenační reakce, jsme odvodili ze zkušeností předchozích sekvenací mtDNA v laboratoři KUP.

Nejvyšší množství produktů v první amplifikační reakci vykazovaly izoláty z bukálních stěrů, ve kterých se hladina fluorescence pohybovala v rozmezí 3500 — 5000 RFU se do sekvenační reakce z počátku užilo 1  $\mu$ l vzorku. U vzorků, jejichž fluorescence se pohybovala v rozmezí 1500 — 3500 RFU, se přidávaly 2  $\mu$ l vzorku do sekvenační reakce (na této fluorescenční hladině se pohyboval koncentrace mtDNA především u izolátu z trichologického materiálu)

- Optimalizace užití vhodného množství vzorku z amplifikační reakce bylo problematické především u vzorků vyizolovaných z bukálních stěrů, kdy užití 1  $\mu$ l vzorku vykazující fluorescenci 4000 RFU se často ukazovalo jako příliš veliké.

Užití pouze 0,5  $\mu$ l vzorku do sekvenační reakce se ukázalo jako optimální. U trichologického materiálu se osvědčilo užití 2  $\mu$ l vzorku při fluorescenci amplifikátu při 1500 — 3500 RFU.

Sekvenace probíhala na termocycleru GA9700 za užití následujícího teplotního profilu:

- úvodní denaturace: 1 min při 96°C
- sekvenační reakce
  - denaturace: 10 s při 96°C
  - annealing primerů: 5 s při optimální teplotě užitého primeru
  - amplifikace: 4 min při 60°C
- ochlazení a uchování:  $\infty$  při 4°C

#### **7.6.1.4. Purifikace amplifikátu II**

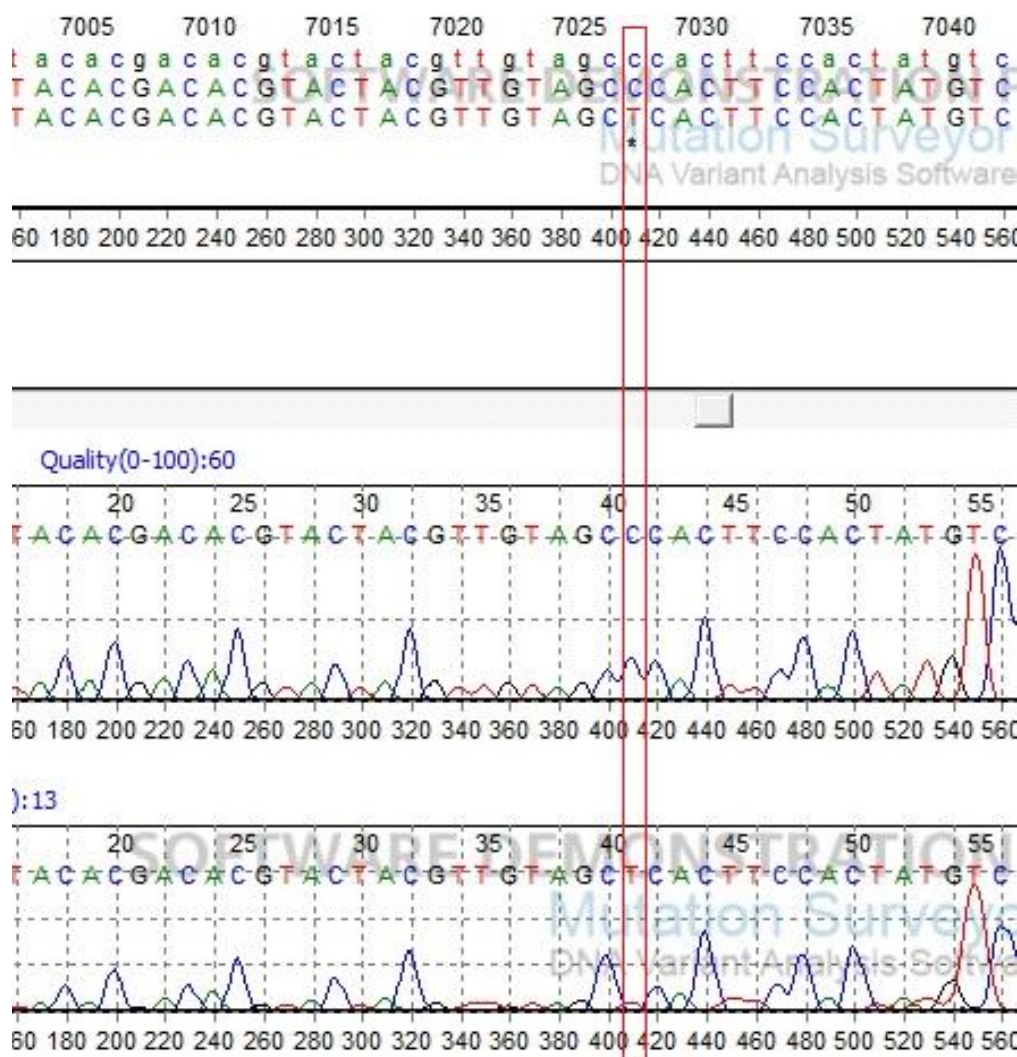
Před analýzou pořadí nukleotidu v sekvenci je nutné provést přečištění amplifikátu od zbylých iontů a primerů. K přečištění bylo užito kitu BigDye XTerminator a tyto reagenty byly přidány přímo do reakční směsi z předchozí reakce (vzorky byly ponechány v původní 96ti jamkové destičce). Do každé jamky s 10  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 45  $\mu$ l SAM™ Solution a 10  $\mu$ l XTerminator™ Solution (obojí z kitu BigDye XTerminator). Takto připravená směs byla inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání na rotační třepačce a následně centrifugována na velké centrifuze po dobu 2 min při 2000 rpm. Jelikož se po tomto kroku nespotebované ionty a primery nacházely na dně jamky a DNA byla rozptýlená v supernatantu, bylo možné přikročit k analýze vzorků na kapilární elektroforéze.

#### **7.6.1.5. Stanovení sekvence mtDNA**

Sekvence mtDNA byla stanovena za užití přístroje pro kapilární elektroforézu - sekvenátoru. Před vložením destičky do sekvenátoru byla destička fixována do speciální ochranné podložky a jamky byly překryty gumovou fólií spolu s pevnou deskou s otvory

nad jamkami, tato ochrana sloužila ke stabilizaci jehly kapiláry. Napětí při nástřiku sekvenátoru bylo 3kV po dobu 10 s.

K vyhodnocení elektroforetogramů získaných sekvenací jsme použili software Mutation Surveyor verze V4.0.8. (SoftGenetics LLC). Porovnání sekvence amplifikačních produktů bylo prováděno vůči sekvenci rCRS. Detail vyhodnocení elektroforetogramu je zobrazen jako Obrázek č. 10.



Obrázek č. 10. Vyhodnocení elektroforetogramu v programu Mutation Surveyor. Tento elektroforetogram zobrazuje analýzu vzorku bukálního stěru označeného kódem vz 30, který byl amplifikován párem primerů C7028T. V horní části obrázku jsou pod sebou tři řádky sekvencí. Prvý řádek zobrazuje sekvenci lemuující pozici C7028T převzatou z rCRS, druhý řádek uvádí sekvenci patřící k prostřednímu grafu zobrazující ideální průběh sekvenace úseků mtDNA o této sekvenci. Třetí řádek uvádí sekvenci námi analyzovaného vzorku, grafické zobrazení elektroforetogramu amplifikátu vzorku je zobrazeno v dolní části obrázku. V červeném rámečku je zvýrazněna analýza pozice C7028T, tato pozice je v horní části obrázku v řádku se sekvencemi nukleotidů označena hvězdičkou značící mutaci na dané pozici. Porovnáním sekvence amplifikátu vzorku vz 30 se sekvencí převzatou z rCRS je patrné, že se sekvence liší pouze v námi analyzované SNP C7028T.

## 8. VÝSLEDKY

Analýza HRM zkoumaných vzorků byla provedena na softwaru LightCycler® 480 Software Release 1.5.0., v programu Gene Scanning a Tm calling.

Teploty tání získané analýzou vzorků programem Tm calling, spolu s nukleotidovou variantou, byly zaznamenány. Výsledky byly následně vyhodnoceny ve statistickém programu R verze 2.15.3.

### 8.1. Výsledky optimalizace amplifikace primeru G3010A a následné HRM analýzy

Jelikož se průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP G3010A převzatého z publikace Brandstätter et al (2003) (sekvence uvedena v Tabulce č. 2) nepodařilo optimalizovat, byl tento pár primerů vyhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM. Kvůli absenci produktů amplifikační reakce byla analýza prohlášena za negativní.

Z tohoto důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů k analýze SNP G3010A (sekvence uvedena v Tabulce č. 3)

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 57°C (viz Obrázek č. 10)
- optimální koncentrace primerů v reakci je 0,35 µM (rozředěno z 20 µM zásobního roztoku primerů v poměru 1:2 dH<sub>2</sub>O)
- optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> v reakci byla stanovena na 2,5 mM (do reakce se přidávaly 2 µl MgCl<sub>2</sub> o koncentraci 25 mM)

Tato optima byla stanovena na základě opakovaného testování.

Na SNP pozici G3010A mtDNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid G nebo záměna nukleotidem A. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 25 vzorků bukalních stěrů získaných od dobrovolníků (viz kapitola Materiál). Díky tomu

se ověřilo, zda je možné produkty amplifikace rozdělit dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu dané pozice. Byla stanovena zóna překryvu teplot tání, ve které se vyskytovaly vzorky jak s alelou G, tak alelou A. Tato zóna byla stanovena mezi teplotami 80,9°C a 81,0°C. Vzorky nacházející se v této zóně byly vyloučeny a dále se s nimi ve statistické analýze nepracovalo. Vzorky spadající svou průměrnou teplotou tání amplifikátů do zóny překryvu byly vyřazeny z toho důvodu, neboť je není možné bez sekvenace jasně definovat a je pravděpodobná nesprávná genotypizace vzorku.

Do optimalizace amplifikační reakce bylo zahrnuto testování vlivu snížení koncentrace vstupního materiálu na teplotu tání amplifikátů. Tabulka s přehledem teploty tání amplifikátů ředící řady vzorků je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, pod označením Tabulka č. 1. Neprokázal se vliv snížené koncentrace mtDNA ve vzorcích na teplotu tání.

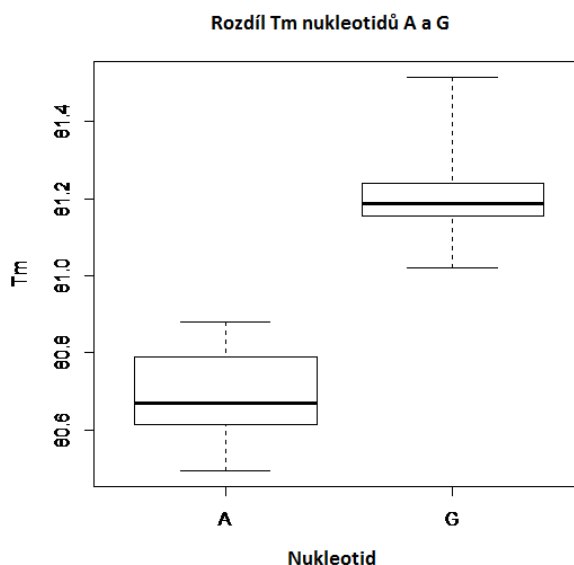
Při optimalizaci tohoto páru primerů nebylo možné sekvenací ověřit příslušné nukleotidové varianty, a to z technických důvodů.

Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů A a G jsou přiloženy v Tabulce č. 4.

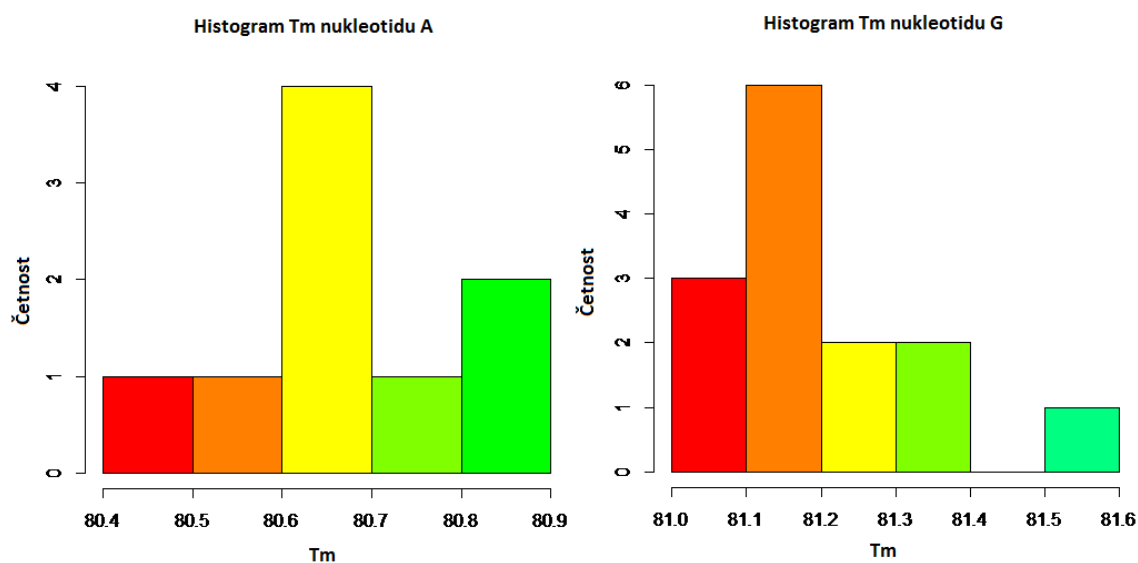
	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
Tm prům.A	80,69	0,14	80,67	80,5	80,88	0,38	80,61	80,79
Tm prům.G	81,2	0,13	81,19	81,02	81,52	0,5	81,16	81,24

*Tabulka č. 4. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A. Tm prům. nukleotidu — průměr teplot tání ze dvou nebo tří měření, Sm. Odch. — směrodatná odchylka, Dol. kvartil — 25% vzorků, Hor. kvartil — 75% vzorků.*

Grafické znázornění rozdělení teplot tání pro nukleotidy A a G pro primery SNP G3010A je zobrazeno v Grafu č. 1. Histogramy distribuce teplot tání pro nukleotid A a G jsou přiloženy v Grafu č. 2.



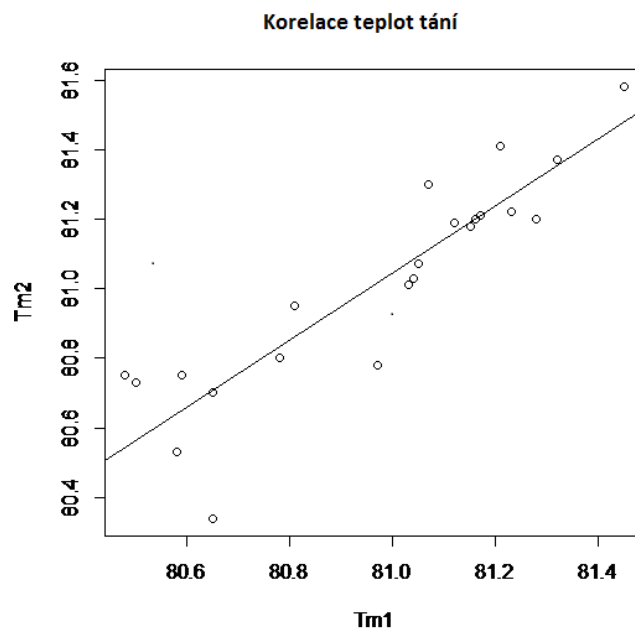
Graf č. 1. Distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukalních stěrů.



Graf č. 2. Histogramy distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukalních stěrů.

Dále bylo zkontrolována korelace teplot tání všech užitých vzorků mtDNA vyizolovaných z bukalních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,90, čili duplikáty vzorků spolu z 90 % korelují (viz Graf č. 3)

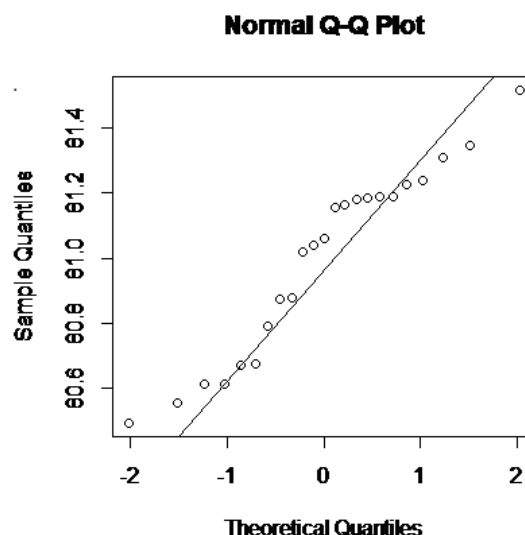




*Graf č 3. Korelace teplot tání vzorků amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukálních stěrů.*

### **8.1.1. Analýza trichologického materiálu**

Protože graf normálního rozdělení Q-Q (viz Graf č. 4) měl nejvíce odlehlých hodnot teplot tání v oblasti mediánu teplot tání nukleotidu G, pro porovnání teploty tání u různých trichologických vzorků byl zvolen neparametrický párový Wilcoxonův test, který nepředpokládá normální rozdělení dat. Užitím tohoto statistického testu byla porovnána DNA z různých biologických materiálů u stejné skupiny osob.



Graf č. 4. Graf normálního rozdělení Q-Q. Rozdělení teplot tání amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukálních stěrů.

Tabulka s přehledem průměrných teplot tání amplifikátů jednotlivých sad vzorků trichologického materiálu v anafázi je přiložena v kapitole Příloha: Tabulky, označeno Tabulka č. 2. Celkem bylo užito trichologických sad od sedmi jedinců.

Výsledky analýzy párovým Wilcoxonovým testem jsou uvedeny v Tabulce č. 5, hladina významnosti byla zvolena 0,05. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota testu	1	9	8	17	16	12
p-hodnota	0,05917	0,8438	0,6875	0,2188	0,3125	0,3125

Tabulka č. 5. Výsledky porovnání neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem. Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu, pro primery G3010A. Testovaný trichologický materiál byl v anafázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení.

Námi položená nulová hypotéza ( $H_0$ ) říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP G3010A) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anafázi se u jedinců statisticky významně neliší.

## **8.2. Výsledky optimalizace amplifikace primeru C7028T a následné HRM analýzy**

Protože průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP C7028T převzatých z publikace Brandstätter et al (2003) (viz Tabulka č. 2) se nepodařilo optimalizovat, byl tento pár primerů zhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM. Z důvodu absence produktů amplifikační reakce byla analýza SNP C7028T prohlášena za negativní.

Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navrženého páru primerů k analýze SNP C7028T (viz Tabulce č. 3).

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 59°C (viz Tabulka č. 9)
- optimální koncentrace primerů v reakci 0,2  $\mu\text{M}$  (rozředěno z 20  $\mu\text{M}$  zásobního roztoku primerů v poměru 1:4 dH<sub>2</sub>O)
- optimální koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  byla stanovena na 2,75 mM v reakci (do reakce se přidávaly 2,2  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ze zásobního roztoku o koncentraci 25 mM)

Výše uvedená optima byla stanovena na základě opakovaného testování.

Na pozici C7028T mtDNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid C nebo záměna nukleotidem T. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 43 vzorků bukálních stěrů získaných od dobrovolníků (viz kapitola Materiál). Testováním této série vzorků byla ověřena možnost rozdělení produktů amplifikace dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu na této SNP pozici. Zóna překryvu teplot tání nukleotidů C a T byla

stanovena v rozmezí 79,8°C — 79,9°C. Vzorky s průměrnou teplotou tání v tomto rozmezí byly vyloučeny ze statistické analýzy.

Do optimalizace amplifikační reakce bylo zahrnuto testování vlivu snížení koncentrace vstupního materiálu na teplotu tání amplifikátu. Tabulka s přehledem teploty tání ředící řady vzorků je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, pod označením Tabulka č. 3. Neprokázal se vliv snížené koncentrace mtDNA ve vzorcích na teplotu tání.

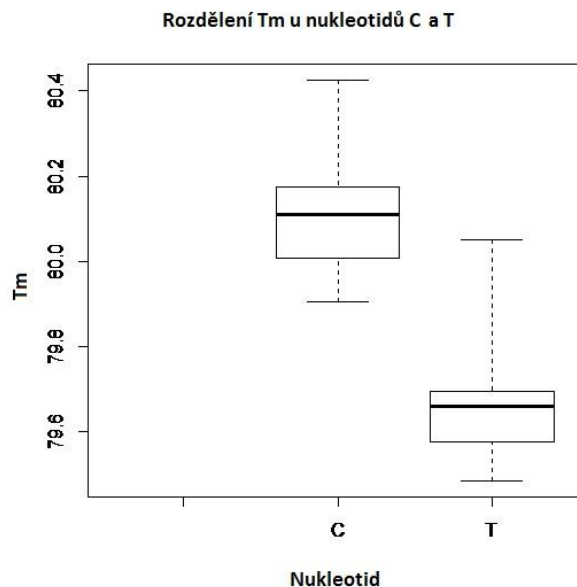
Vybrané vzorky byly osekvenovány, aby se ověřila varianta nukleotidu na dané pozici. V námi sekvenovaných vzorcích nebyly odhaleny další pozice, které by podléhaly mutaci a tím ovlivnily teplotu tání.

Tabulka popisných statistik distribuce teplot tání amplifikátů obsahujících nukleotidy C a T jsou přiloženy v Tabulce č. 6.

	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
Tm prům.C	80,12	0,14	80,11	79,91	80,42	0,52	80,01	80,17
Tm prům.T	79,68	0,16	79,66	79,48	80,05	0,56	79,57	79,69

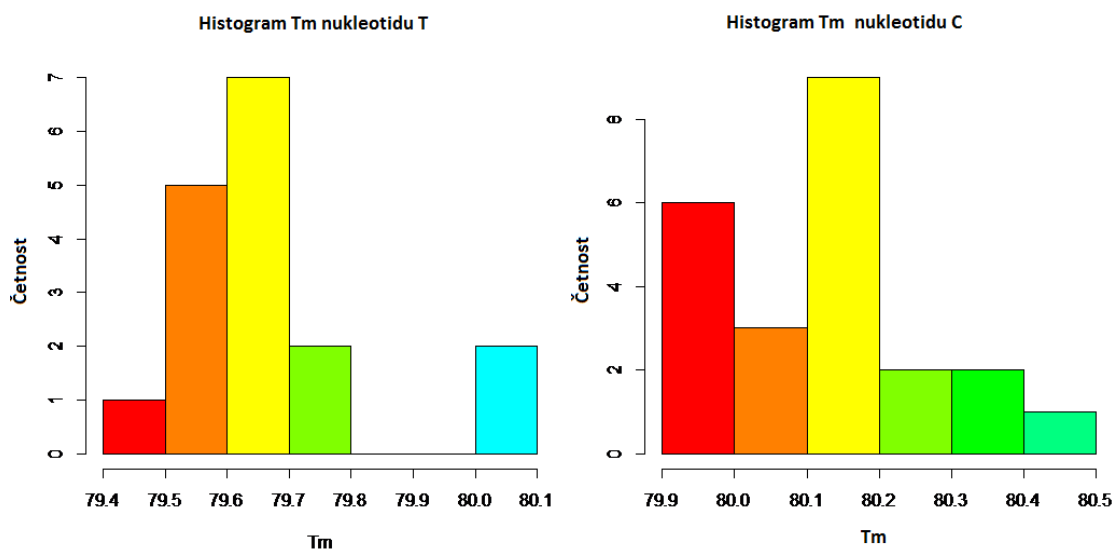
*Tabulka č. 6. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C7028T. Tm prům. nukleotidu- průměr teplot tání ze dvou nebo tří měření, Sm. Odch. — směrodatná odchylka, Dol. kvart. — dolní kvartil, 25% vzorků, Hor. kvart. — horní kvartil, 75% vzorků*

Grafické znázornění rozdělení teplot tání amplifikátů obsahujících nukleotidy C a T pro primery SNP C7028T je zobrazeno v grafu č. 5.



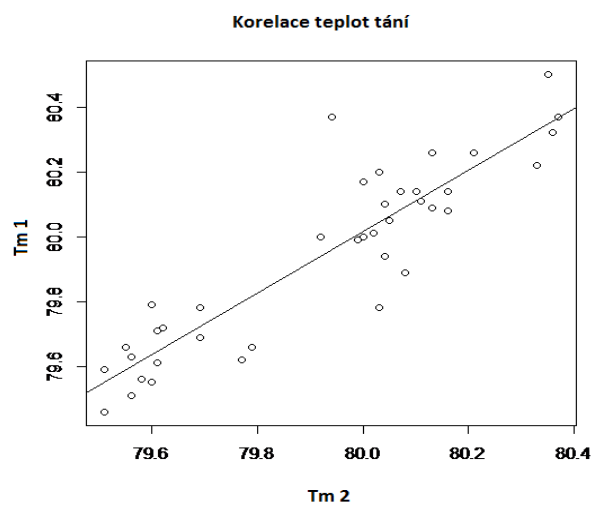
Graf č. 5. Distribuce teplot tání nukleotidu C a T amplifikátů primerů C7028T, separováno z bukálních stěrů.

Histogramy distribuce teploty tání amplifikátů nukleotidů T a C jsou přiloženy v Grafu č. 6.



Graf č. 6. Histogramy distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP C7028T separovaných z bukálních stěrů.

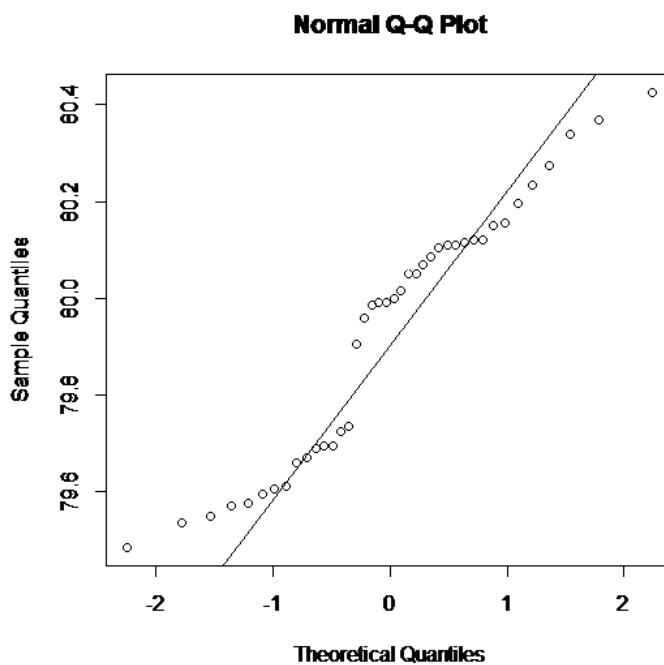
Dále bylo stanovena korelace teplot tání izolátů bukálních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,905, čili teplota tání duplikátů vzorků spolu z 90,5 % koreluje (viz Graf č.7.)



Graf č. 7. Korelace vzorků mezi  $T_{m1}$  a  $T_{m2}$  amplifikátů primerů SNP C7028T.

### 8.2.1. Analýza trichologického materiálu

Graf normálního rozdělení Q-Q (viz Graf č. 8) měl nejvíce odlehlých hodnot teploty tání v oblasti mediánu teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotid C. Pro porovnání teploty tání u různých vzorků byl proto opět zvolen neparametrický párový Wilcoxonův test.



Graf č. 8. Graf normálního rozdělení Q-Q. Rozdělení teplot tání amplifikátů primerů SNPC7028T separovaných z bukálních stěrů.

Tabulka s přehledem teplot tání jednotlivých sad vzorků trichologického materiálu v anafázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, označena jako Tabulka č. 4.

Výsledky analyzování párovým Wilcoxonovým testem, kde hladina významnosti byla zvolena 0,05, jsou v tabulce č. 7. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota testu	19,5	24,5	27	33	29	32
p-hodnota	0,444	0,8558	1	0,625	0,9219	0,6953

*Tabulka č. 7. Výsledky porovnání neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem. Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu, pro primery C7028T. Testovaný trichologický materiál byl v anafázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení*

Námi položená nulová hypotéza ( $H_0$ ) říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C7028T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anafázi se u jedinců statisticky významně neliší.

Tabulka s přehledem teplot tání sad trichologického materiálu v telofázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, pod označení Přílohy — tabulka č. 5.

Byla provedena analýza párovým Wilcoxonovým testem, kdy se porovnávala teplota tání amplifikátů vyizolovaných ze vzorků bukálních stěrů a vlasů v telofázi. Hladina významnosti byla zvolena 0,05. Hodnota testu byla 55, p- hodnota 0,001953. Výsledek analýzy tedy zamítá  $H_0$ , což znamená, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C7028T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru a vlasů v telofázi se u jedinců liší.

### **8.3. Výsledky optimalizace amplifikace primeru C14766T a následné HRM analýzy**

Jelikož průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP C14766T převzatých z publikace Brandstätter et al (2003) (viz Tabulka č. 2) se nepodařilo optimalizovat, byl tento pár primerů zhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM. Analýza byla prohlášena za negativní z důvodu absence produktů amplifikační reakce.

Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů k analýze SNP C14766T (viz Tabulka č. 3)

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 59°C
- optimální koncentrace primerů v reakci 0,35  $\mu\text{M}$  (rozředěno ze zásobního roztoku primerů v poměru 1:2 dH<sub>2</sub>O)
- optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> byla stanovena na 2,5 mM (do reakce se přidávaly 2  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> ze zásobního roztoku o koncentraci 25 mM)

Optima byla potvrzena na základě opakovaného testování.

Na pozici 14766 mitochondriální DNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid C či záměna za nukleotid T. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 47 vzorků bukalních stěrů získaných od dobrovolníků. Díky testování se ověřilo, zda je možné produkty amplifikace rozdělit dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu na SNP C14766T. Zóna překryvu teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T byla stanovena v rozmezí 75,8°C — 76,0°C. Amplifikáty vzorků s touto průměrnou teplotou byly vyloučeny z dalšího statistického vyhodnocení.

Do optimalizace bylo zahrnuto testování vlivu snížené koncentrace vstupního materiálu DNA do amplifikační reakce. Tabulka s přehledem teplot tání amplifikátů vzorků ředící



řady je přiložena v kapitole Přílohy - Tabulky jako Tabulka č. 6. Neprokázal se vliv snížené koncentrace mtDNA v testovaných vzorcích na teplotu tání amplifikátů primerů.

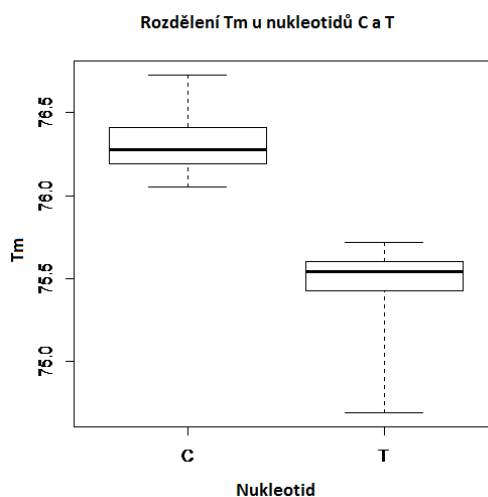
Vybrané vzorky byly osekvenovány, aby se ověřila varianta nukleotidu na pozici C14766T. V námi sekvenovaných vzorcích nebyly odhaleny další pozice, které by podléhaly mutaci a tím ovlivnily teplotu tání.

Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotidy C a T jsou přiloženy v Tabulce č. 8.

	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
T <sub>m</sub> prům.C	76.31	0.19	76.28	76.05	76.73	0.68	76.19	76.41
T <sub>m</sub> prům.T	75.48	0.23	75.55	74.69	75.72	1.3	75.43	75.60

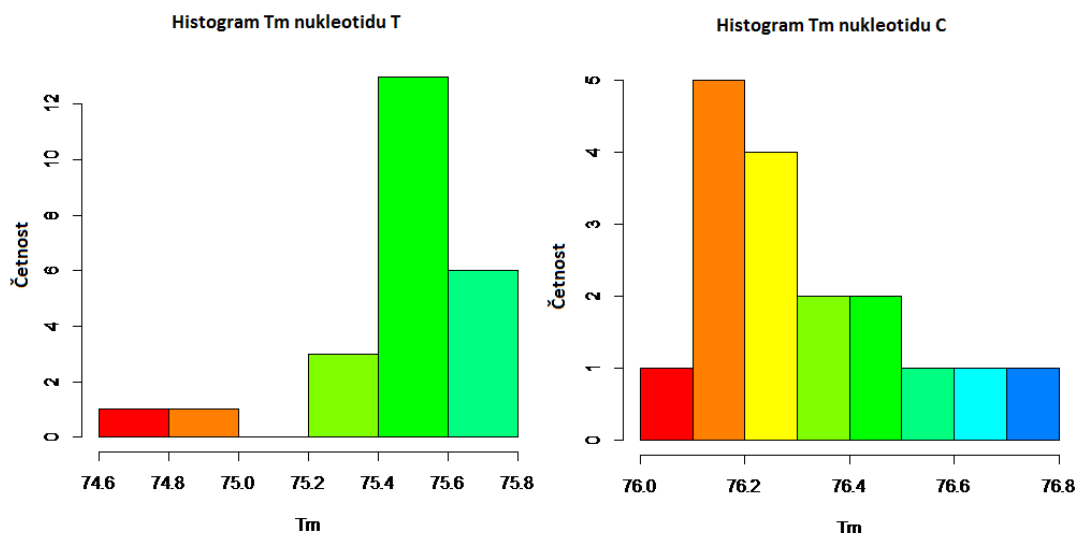
Tabulka č. 8. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání amplifikátů nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C14766T.

Grafické znázornění rozdělení teplot tání pro nukleotidy C a T pro primery SNP pozice 14766 je zobrazeno v Grafu č. 9.



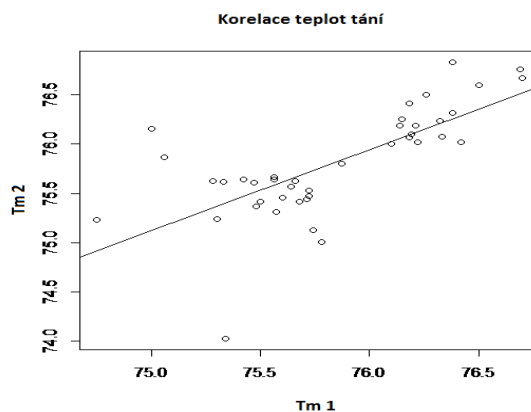
Graf č.9. Distribuce teplot tání nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C14766T separovaných z bukalních stěrů.

Histogramy distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotid T a C na pozici C14766T jsou přiloženy v Grafu č. 10.



Graf č. 10. Histogramy distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotidů A a G primerů SNP C14766T separovaných z bukálních stěrů.

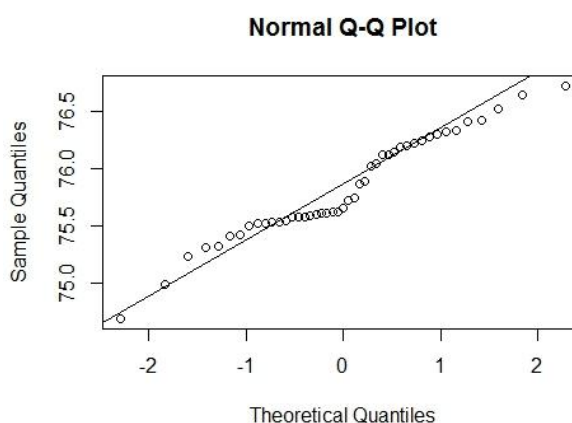
Dále byla zkontrolována korelace teplot tání amplifikátů užitých vzorků bukálních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,71, tedy duplikáty vzorků spolu ze 71 % korelují (viz Graf č.11.).



Graf č. 11. Korelace mezi Tm1 a Tm2 amplifikátů primerů SNP C14766T separovaných z bukálních stěrů.

### 8.3.1. Analýza trichologického materiálu

Jelikož graf normálního rozdělení Q-Q (viz Graf č. 12) měl nejvíce odlehlých hodnot teploty tání v oblasti mezi teplotou tání nukleotidů T a C, byl pro porovnání teplot tání u různých vzorků trichologického materiálu opět zvolen neparametrický párový Wilcoxonův test nepředpokládající normální rozdělení. Užitím tohoto statistického testu byla porovnána DNA z různých biologických materiálů u stejné skupiny osob.



*Graf č. 12. Graf normálního rozdělení Q-Q. Rozdělení teplot tání amplifikátů primerů SNPC14766T separovaných z bukálních stěrů.*

Tabulka s přehledem teplot tání jednotlivých vzorků sad trichologického materiálu v anafázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, uvedeno jako Tabulka č. 7.

Výsledky analýzy párovým Wilcoxonovým testem, kde hladina významnosti byla zvolena 0,05, jsou v Tabulce č. 9. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota test.	22	25	44	23	46	38
p-hodnota	0,625	0,8203	0,1055	1	0,0645	0,0742

*Tabulka č. 9. Výsledky porovnání neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem-primery SNP C14766T. Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu. Testovaný trichologický materiál byl v anafázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení.*

Námi položená  $H_0$  říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C14766T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anafázi se u jedinců statisticky významně neliší.

Tabulka s přehledem teplot tání sad trichologického materiálu v telofázi je přiložena v Tabulce č. 8 v kapitole Přílohy: Tabulky.

Byla provedena analýza párovým Wilcoxonovým testem, kdy se porovnávala teplota tání amplifikátů vyizolovaných ze vzorků bukálních stěrů a vlasů v telofázi. Hladina významnosti byla zvolena 0,05. Hodnota testu byla 13, p hodnota byla 0,3008. Výsledek analýzy nevyvrátil  $H_0$ , na základě čehož je možné prohlásit, že se teplota tání amplifikátů (a tím i varianta nukleotidu SNP 14766 mtDNA) vyizolované z bukálního stěru a vlasů v telofázi se u jedinců neliší.

#### **8.4. Výsledky optimalizace amplifikace primerů A2706G a G12372A a následné HRM analýzy**

Amplifikační reakce primerů k SNP pozicím A2706G a G12372A převzaté z publikací (viz Tabulka č. 2) se nepodařila optimalizovat. Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů (uvedeny v Tabulce č. 3). Jelikož nebylo možné ani u těchto primerů optimalizovat průběh amplifikační reakce, byly primery vyhodnoceny jako nevhodné pro analýzu vybraných SNP pozic metodou HRM. Analýza těchto SNP pozic byla vyloučena ze studie.

## 9. DISKUSE

### 9.1. Analyzační program

Pro hodnocení výsledků analýzy metodou HRM bylo užito softwaru LightCycler<sup>®</sup> 480 Software Release 1.5.0., program Gene Scanning a Tm calling. Program Gene Scanning je přímo určený k analýze výsledků analýzy HRM. Výstupem analýzy je rozdělení vzorků porovnáním teplot tání amplifikátů se zadanými standardy variant dané pozice SNP, v závislosti na ručně nastavené citlivosti programu.

Jako největší nevýhodou tohoto programu se jeví nemožnost nastavení rozpětí teplot tání amplifikátů pro každou variantu nukleotidu dle popisných charakteristik teplot tání uvedených ke každé optimalizované analýze SNP v kapitole 8 (tabulka č. 4, č. 6, 8). Vysoká citlivost programu bez možnosti jasného definování teplotní šíře má za následek rozdělení vzorků do více kategorií, než pouze do dvou kategorií podle předpokládaného typu nukleotidů každého SNP. Správného rozdělení vzorků jsme se snažili docílit změnou nastavení citlivosti („Senzitivity“), přibližně o poloviční hodnotu než je doporučováno (tj. namísto hodnoty 0,3 byla zadávaná hodnota mezi 0,15-0,2). Hladina citlivosti byla natolik nízká, že vzorky byly rozděleny do dvou až tří skupin, přesto stanovení nukleotidů u vzorků nebylo ideální.

Lépe se vyhodnocovaly vzorky v programu Tm calling, kde byla uváděna přesná hodnota teplota tání amplifikátů každého vzorku, spolu s lepším grafickým znázorněním průběhu teploty tání amplifikátu. Jelikož je průběh teploty tání zobrazen první zápornou derivací křivky tání, ve kterém jsou teploty tání vzorků zobrazeny jako píky, je možné podchytit odchylky od standardního průběhu tání, především vznik nespecifických produktů, které mohou mít vliv na teplotu tání.

### 9.2. Úspěšnost izolace mtDNA z trichologického materiálu

Vzhledem k předpokládanému nízkému obsahu mtDNA, byla jako součást izolační metody využita možnost zkoncentrovat izolát mtDNA z trichologických vzorků do menšího objemu Elution Buffer než je předepsáno výrobcem izolačního kitu (viz str 32) Díky tomu

jsme měli k dispozici dostatečné množství koncentrovaného izolátu mtDNA z trichologického materiálu pro testování všech párů primerů (či případné sekvenace).

Kvantifikace nDNA byla stanovena pouze u vzorků izolátů bukálního stěru. Pokusně byla též provedena kvantifikace nDNA tří izolátů vlasů v anafázi a tří izolátů vlasů v telofázi. Tímto pokusem byla ověřena zkušenost laboratoře KUP s výsledky kvantifikace trichologického materiálu v telogenní (anagenní) fázi. Jelikož tato kvantifikace neprokázala přítomnost nDNA, další vzorky trichologického materiálu již kvantifikovány nebyly a do amplifikační reakce byl vždy přidán 1 µl vzorku

Dle studie Andréasson et al (2006) je možné předpokládat vyšší výtěžnost separace mtDNA z upraveného trichologického materiálu v anafázi (kapitola 6.1.1.) a nižší v případě, že je trichologický materiál v telofázi. Výtěžnost izolační metody byla vztažena k množství amplifikačního produktu (odvozeno od výšky píku v RFU) a tomu předpokladu odpovídá. Z celkového množství vzorků trichologického materiálu v anafázi, 36 vzorků, se podařila izolace mtDNA v detekovatelném a analyzovatelném množství u 30ti vzorků, což je 83,3% z celkového množství vzorků. Naproti tomu bylo užito celkem 17 vzorků trichologického materiálu v telofázi, ze kterých se detekovatelné množství mtDNA podařilo vyizolovat z deseti vzorků, což je 58,8%. Ačkoliv výtěžnost odpovídá našim počátečním předpokladům, rozdíl ve výtěžnosti mohl být také způsoben několika dalšími důvody:

- Ačkoliv jsme trichologický materiál v anafázi upravovali odstříhnutím prvního centimetru obsahující kořínky vlasového stvolu spolu s pochvami vlasového kořínku (zdroj nDNA a mtDNA), je možné, že v užitých vzorcích zbyla část měkkých tkání obsahující zvýšené množství mtDNA.
- Dále je možný vliv stáří samotného vlasu a možné délky degradačních vlivů na mtDNA. Vlasy v telofázi jsou trichologickým materiálem, který je v rámci kapilicie nejdéle setrvávajícím trichologickým materiálem a oproti trichologickému materiálu v anafázi delší dobu podléhá vlivům UV záření či běžně užívaným chemikáliím (mytí vlasů a jiné).

- Další vliv na analýzu mtDNA vyizolované z trichologického materiálu měla do jisté míry citlivost primerů. V Příloze — Tabulky je pro každý z optimalizovaných primerů uveden přehled teplot tání (Příloha — Tabulka č. 1, č. 3, č. 6), kdy se testovala citlivost primerů na snížení množství vyizolované DNA.

Z výsledků teplot tání je patrné, že primer C7028T je nejcitlivějším z optimalizovaných primerů. U 50 000krát ředěného roztoku zkušební roztoku se opakovaným testováním podařilo analyzovat amplifikované vzorky. Zároveň užitím těchto primerů bylo možné analyzovat všech 10 sad trichologického materiálu v anafázi (Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 4).

Naproti tomu u primerů k pozicím C14766T a G3010A je patrná nižší citlivost, díky čemuž se nepodařila analýza vzorku vz54 — axilární ochlupení (Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 2 a č. 7) či analýza vzorku pubického ochlupení vz55 (Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 2).

Je tedy možné, že v některých vzorcích izolátů vlasů v telofázi byla vyizolována mtDNA — toto množství však bylo natolik nízké, že se nacházelo pod citlivostí užitých primerů, a proto nebyla možná analýza těchto vzorků.

### **9.3. Diskuse k výsledkům analýzy trichologického materiálu pomocí metody HRM**

#### **9.3.1. Primer G3010A**

Funkčnost primeru a schopnost genotypovat amplikony dle dané varianty nukleotidu byla testována na 25 vzorcích bukálních stěrů. Po ověření funkčnosti bylo analyzováno celkem 7 trichologických sad v anafázi (výsledky jsou uvedeny v kapitole Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 2).



Jako zóna překryvu teplot tání pro nukleotidové varianty SNP G3010A bylo stanoveno rozmezí 80,9°C až 81,0°C. Vzorky spadající opakovaným testováním do této zóny je vhodné podstoupit další analýze, například sekvenaci, jinak hrozí špatné označení nukleotidové varianty daného vzorku. Z výše zmíněných důvodů byly z testovaného souboru izolátů bukálních stěrů vyloučeny dva vzorky.

Snížený počet užitých vzorků byl způsoben technickými problémy, které se v průběhu práce nepodařilo vyřešit. Tyto problémy měly za následek i nemožnost provést ověření nukleotidových variant přímou sekvenací. Nižší počet vzorků byl ve statistickém hodnocení zohledněn mimo jiné užitím párového neparametrického Wilcoxonova testu, který umožňuje statisticky zhodnotit malý počet vzorků a nepředpokládá normální rozdělení dat.

Na rozdíl od následujícího primeru k pozici C7028T (viz. 9.3.2.) v průběhu optimalizace ani testování trichologických sad v anafázi se nevyskytovaly vzorky, které by svojí průměrnou teplotou tání zasahovaly mimo rámec teplot tání pro danou variantu nukleotidu pozice G3010A.

Z toho důvodu není předpoklad, že by došlo k zamítnutí  $H_0$ , která v tomto případě říká, že teploty tání izolátu bukálního stěru a trichologického materiálu v telofázi se neliší. Jelikož nebyla možná analýza trichologického materiálu v telofázi, nemůžeme tuto domněnku potvrdit statistickou analýzou.

### **9.3.2. Primer C7028T**

Zóna překryvu teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T byla stanovena v rozmezí 79,8°C — 79,9°C. Vzorky amplifikátů s průměrnou teplotou tání v tomto teplotním rozmezí byly vyloučeny ze statistické analýzy (celkem 3 vzorky).

Ačkoliv párový neparametrický Wilcoxonův test nezamítl  $H_0$  hovořící o shodě teplot tání (nukleotidové variantě pozice C7028T) různého trichologického materiálu v anafázi, rádi bychom poukázali na sadu vzorků od osoby označené vz54 (viz Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 4), kdy sekvenací bylo potvrzeno, že se na SNP pozici všech typů vzorků (bukální stěr,

vlasů, axilární ochlupení, pubic. ochlupení) nachází nukleotid T. Teploty tání jednotlivých biologických materiálů se v rámci jedince velmi lišily, teplota tání amplifikátu bukálního stěru a vlasů ležela blízko mediánu pro nukleotid T, teplota tání amplifikátu axilárního a pubického ochlupení již leželo v teplotním pásmu pro nukleotid C (v případě axilárního ochlupení teplota tání ležela v oblasti horního kvartilu, teplota tání pubického ochlupení v mediánu teploty tání pro nukleotid C). Tyto vzorky byly opakovaně testovány se shodnou teplotou tání, proto byla vyloučena chyba v přípravě reakční směsi či vlivu vnitřního reakčního prostředí reakčního běhu. U těchto odlehlých vzorků se nepodařilo zjistit příčinu zvýšené teploty tání.

Podobný případ nastal u vzorků bukálních stěrů, které byly užity k ověření schopnosti HRM metody genotypizovat vzorky dle teploty tání. Jedná se o dvě odlehlé hodnoty (viz Graf č. 5, Graf č. 6 kapitoly Výsledky), zasahující svou teplotou tání do dolního kvartilu distribuce teplot pro nukleotid C. Protože se ani v těchto případech nepodařilo objasnit příčinu zvýšené teploty tání amplifikátu mající nukleotid T, je tedy nutné při genotypizaci námi užitými primery SNP C7028T počítat s určitou možností vzniku falešně pozitivní genotypizace vzorku, kdy vzorek označený jako alela C může být ve skutečnosti alelou T.

Párový neparametrický Wilcoxonův test porovnávající teploty tání amplifikátů bukálních stěrů a vlasů v telofázi zamítl  $H_0$ . To znamená, že byla zamítnuta hypotéza, že teploty tání (respektive varianty nukleotidů SNP C7028T) vyizolované mtDNA z bukálních stěrů a trichologického materiálu v telofázi se neliší.

Toto zamítnutí bylo pravděpodobně způsobeno vysokým rozdílem teplot tání vzorků genotypovaných jakožto C. Vzorky vyizolované z bukálních stěrů vykazovaly teploty tání v oblasti překryvu tání pro nukleotid T a C, popřípadě mediánu teploty tání pro nukleotid C. Amplifikáty příslušných vzorků vlasů v telofázi měly naopak teplotu tání nad maximální teplotou pro nukleotid C (viz Přílohy — Tabulka č. 5).

V průběhu optimalizace primerů byla testována citlivost na množství vstupní mtDNA na teplotu tání amplifikátů (viz Přílohy — Tabulka č. 3) vliv snížené koncentrace na Teplotu tání amplifikátů však nebyl pozorován. Jelikož všechny vzorky trichologického

materiálu byly izolovány dle stejného protokolu, nedomníváme se, že by izolační technika měla vliv na teplotu tání amplifikátů. Důvody, proč vzorky vlasů v telofázi alely C měly zvýšenou teplotu tání, se nepodařilo zjistit.

Na základě výše uvedených zjištění se domníváme, že k analýze trichologického materiálu pomocí námi užitých primerů SNP C7028T metoda HRM není vhodná pro trichologický materiál v telofázi, nicméně nezamítnutím  $H_0$  pro porovnání trichologického materiálu v anafázi je možné uvažovat o využití tohoto primeru pro genotypizaci tohoto typu vzorků.

### **9.3.3. Primer C14766T**

Byla stanovena teplotní zóna překryvu teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T, a to v rozmezí teplot 75,8°C až 76,0°C. Ze statistické analýzy byly vyloučeny celkem 4 vzorky (z důvodů uvedených výše).

## **9.4. Zařazení analyzovaných vzorků do haploskupin**

Jedním z cílů této práce byla možnost zařazení analyzovaných vzorků do příslušných haploskupin v závislosti na přiřazené nukleotidové variantě jednotlivých SNP. Vzhledem k těsnému vztahu vybraných SNPs (viz kapitola 7.5), a z důvodů popsaných v kapitole Výsledky, nemohla být většina kombinací stanoveného genotypu využita pro jednoznačné přiřazení do haploskupin.

Nemožnost zařazení vzorků do haploskupin je zapříčiněna především vyjmutím páru primerů analyzujících SNPs A2706G a C7028T. V případě absence transice u těchto SNPs, spadá vzorek do haploskupiny H. Aby bylo možné stanovit, zda vzorek spadá do subhaploskupiny H1 (stanovení pomocí SNP G3010A, zařazení do H1 je stanoveno výskytem alely A), vzorek zároveň musí spadat do haploskupiny H, což u části vzorků není možné stanovit.

Pomocí SNPs G12372A a C14766T se stanovuje zařazení do haploskupiny U v případě, že na obou pozicích se vyskytuje substituce za mutovanou alelu a současně u daného vzorku

díky SNP C7028T nebo A2706G byla stanovena jako jiná haploskupina než haploskupina H. Díky absenci analýzy pozice G12732A a částečné absenci analýzy pozice C7028T není možné vzorky zařadit do haploskupiny U.

Na základě výše uvedených skutečností bude analýza SNP G3010A, C14766T (analýza trichologického materiálu v anafázi a telofázi) a pozice C7028T (analýza trichologického materiálu v anafázi) využita pouze ke genotypizaci daných pozic, nikoliv k zařazení do příslušných haploskupin

## **9.5. Využití ve forenzní genetice**

Díky typu dědičnosti mtDNA není možné nahlížet na identifikace vzorků na úrovni jedince, ale využít identifikaci trichologického materiálu ve smyslu porovnání vzorků s referenčním vzorkem. V praxi by se po vyloučení vzorků, které se svým genotypem neshodují s profilem referenčního vzorku, dále pracovalo se vzorky vykazující tuto shodu — například je možné vzorky sekvenovat. Liší-li se vzorek vůči referenčnímu vzorku, je málo pravděpodobné, že vzorky pocházejí ze stejného zdroje jedince a je tedy možné vyloučení. Při shodnosti však zároveň není možné potvrdit shodu zdroje jedince. Proto je nutné na tuto metodu nahlížet jakožto na metodu podpůrnou ke stávajícím genotypizačním metodám a brát ji jako zdroj informace pro typ vzorků, které není možné analyzovat a identifikovat metodami současné forenzně-genetické praxe.

## 10. ZÁVĚR

Celkem bylo vytipováno 5 SNP pozic lokalizovaných na mtDNA. Tyto pozice stanovují nejčtenější evropské haploskupiny (haploskupinu H, subhaploskupinu H<sub>1</sub> a haploskupinu U), proto byla vysoká pravděpodobnost možnosti podchycení obou možných alel každého polymorfismu v námi studovaném souboru vzorků biologického materiálu.

Vybrané polymorfismy byly nejprve optimalizovány na souboru izolátu mtDNA z bukálních stěrů, poté byly testovány dva soubory vzorků trichologického materiálu. Trichologický materiál v anafázi (vlasy, axilární a pubické ochlupení, bukální stěr) a trichologický materiál v telofázi (vlasy a bukální stěr).

Celkem byla optimalizována analýza 3 SNP pozic. K pozicím G3010A, C14766T a C7028T se podařilo úspěšně optimalizovat průběh amplifikační reakce, včetně analýzy nukleotidu SNP v amplifikátu příslušného vzorku. Na základě statistického vyhodnocení pro trichologický materiál v anafázi a telofázi pro SNP G3010A a C14766T platí, že není signifikantní rozdíl mezi mtDNA vyšetřovaného nukleotidu u různého biologického materiálu jedinců. U primeru C7028T bylo toto tvrzení potvrzeno pouze u trichologického materiálu v anafázi.

Z důvodu úzké provázanosti SNP pozic stanovující haploskupiny a úplného vyloučení analýzy dvou SNP pozic z této studie, analyzované pozice nemohou sloužit ke stanovení haploskupiny, ale pouze ke genotypizaci dané pozice.

Na základě této studie byl připraven protokol k analýze trichologického materiálu metodou HRM pozic G3010A, C7028T, C14766T. Tento protokol je možné užít ve forenzní praxi.

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

- Anderson S, Bankier AT, Barrell G, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Andréasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. 2006. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International* 164: 56-64.
- Andrews R, Kubacka I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nature Genetics* 23:147.
- Anonym 2006. HRM Assay Design and Analysis CorProtocol™ 6000-1-July06. RCorbertt Reaserch.
- Brandstaetter A, Parson JT, Parson W. 2003. Rapid screening of mtDNA coding region SNPs of the identificaion of west European Caucasian haplogroups, *International Jurnal of Legal Medicin* 117: 291- 298.
- Brandstaetter A, Salas A, Niederstaetter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W. 2006. Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis*, 27, 13: 2541-2550.
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 2: 177-186.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. 2003. Forensic and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4: 119-141.
- Danielko DM, Ring BD, Pierce GF, 1996. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Molecular Medicine Today* 2: 460-467.

- Deedrick DW. 2000. Part 1: Hair Evidence. Forensic Science Communications 2, 3. [Online] [Citováno v únoru 2013] Dostupné na: <<http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/deedrick.htm>>.
- Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parson TJ, Barrett SM. 2004. Naming the dead — confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. Forensic Science Review, 16: 64- 89.
- Finnila S, Lehtonen S, Majamaa K. 2001. Phylogenetic Network for European mtDNA. American Journal of Human Genetics 68: 1475-1484.
- Fischer H, Eckhart L, Mildner M, Jaeger K, Buchberger M, Ghannadan M, Tschachler E. 2007. DNase1L2 Degrades Nuclear DNA during Corneocyte Formation. Journal of Investigative Dermatology 127: 24-30.
- Gabriel MN, Calloway CD, Reynolds RL, Primonac D. 2003. Identification of Human Remains by Immobilized Sequence — specific Oligonucleotide Probe Analysis of mtDNA Hypervariable Regions I and II. Croatian Medical Journal 44: 293-298.
- Gill P, Ivanov P.L, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nature Genetisc 6: 130-135.
- Gilles RE, Blanc H, Cann HM, Wallance DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77: 6715-6719.
- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. 2003. Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed - Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. Clinical Chemistry 49:3, 396-406.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. Annual Review of Biochemistry 67: 425-479.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 10: 413-417.

- Holland MM, Parson TJ. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review* 11: 21-50.
- Kaufman KD. 1996. Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatologic Clinics* 14, 4: 697-711.
- Koehmann S, Hohoff C, Pfeiffer H. 2009. An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. *Mitochondrion* 9, 5: 370- 375.
- Lipsky RH, Mazzanti CM, Rudolph JG, Xu K, Vyas G, Bozak D, et al. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphism. *Clinical Chemistry* 47: 635-44.
- Monis PT, Giglio S, Saint Ch P. 2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* 340: 24-34.
- Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 46: 647-660.
- Morioka K, 2005. *Hair Follicle. Differentiation Under the Electron Microscope*. Springer-Verlag Tokyo Berlin Heidelberg New York.
- Obana N, Chang C, Uno H. 1997. Inhibition of hair growth by testosterone in the presence of dermal papilla cells from the frontal bald scalp of the postpubertal stump-tailed macaque. *Endocrinology* 138:: 356-61.
- Panteleyev AA, Jahoda CAB, Christiano AM. 2001. Hair follicle predetermination. *Journal of Cell Science* 114: 3419-3431.
- Paulus R, Cotsarelis G. 1999. The Biology of Hair Follicles. *The New England Journal of Medicine* 341 (7): 491-7.



- Petraco N. 1985. The occurrence of trace evidence in one examiner's casework. *Journal of Forensic Sciences* 30, 2: 485-493.
- Pfeiffer H, Hühne J, Ortmann C, Waterkamp K, Brinkmann B. 1999. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts — success rates and sequence comparisons. *International Journal of Legal Medicine* 112: 287 — 290.
- Pinz KG, Bogenhagen DF. 1998. Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Molecular et Cellular Biolology* 18: 1257-1265.
- Říhová Vlasta, 1951. Vady a choroby vlasů (trichologie), Zdravotnické nakladatelství.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Sanger F, Nicklen S. Coulson AR. 1977. DNA sequencig with chain — terminating inhibitors. *Biochemistry, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463 — 5467.
- Satoh M, Kuroiwa T. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research* 196, 1: 137-140.
- Scheffler IE. 1999. Mitochondria. Wiley, New York.
- Simons AF, Cummins JM. 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implicaitons for theories on human evolution, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 93: 13859-13863.
- Slominski A, Paus R, Plonka P. et al. 1994. Melanogenesis during the anagen-catagen-telogen transformation of the murine hair cycle. *The Journal of Investigative Dermatology* 102: 862-9.
- Stoneking M. 1994. Mitochondrial DNA and human evolution. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 251-259.
- Strauss E. 1999. Can Mitochondrial Cloks Keep Time? *Science* 283, 5407: 1435-1438.

- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis, *Cell* 102: 451-461.
- Wallace CD, Brown DM, Lott MT. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211-230.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 4: 506-13.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* 22: 130-138.
- Wittwer CT, Reed GG, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49, 6: 853-860.

## 12. PŘÍLOHY

### 12.1. Tabulky

testování ředění vzorků - primer G3010A			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	81,3	81,26	81,32
100x	81,19	81,15	81,29
500x	81,16	81,13	81,17
1000x	81,25	81,25	81,3
5000x	81,26	81,19	81,19
10000x	81,24	81,2	80,85
20000x	81,27	81,2	NA
50000x	81,2	NA	NA

Tabulka č. 1. Přehled výsledků teplot tání pro amplifikáty primeru G3010A. Testování teplot tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci *nDNA* 1ng / 1 $\mu$ l, ředění uvedeno v tabulce.

	primer G3010A				
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	80,67	80,73	80,76	80,68	A
vz 30	81,14	81,83	81,26	81,22	G
vz 45	81,17	81,26	81,43	81,20	G
vz 53	81,52	81,63	81,28	81,29	G
vz 54	81,35	81,35	NA	81,92	G
vz 55	80,81	80,92	80,69	NA	A
vz 67	80,79	80,77	80,71	80,75	A

Tabulka č. 2. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery G3010A. Užitý trichologický materiál byl v anafázi. *Tm buk* - teplota tání izolátu bukálního stěru, *Tm vl* - teplota tání izolátu vlasů, *Tm ax* - teplota tání izolátu axilárního ochlupení, *Tm pub* - teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

testování ředění vzorků - primer C7028T			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	79,81	79,68	79,84
100x	79,74	79,75	79,81
500x	79,78	79,77	79,75
1000x	79,67	79,77	79,68
5000x	79,79	79,79	79,79
10000x	79,52	79,46	79,47
20000x	79,54	79,53	79,54
50000x	79,55	79,64	79,55

Tabulka č.3. Přehled výsledků teplot tání ( $T_m$ ) pro amplifikáty primeru C7028T. Testování teploty tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci nDNA 1ng / 1 $\mu$ l, ředění uvedeno v tabulce.

	primer C7028T				
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	79,67	79,58	79,42	79,50	T
vz 30	80,05	80,37	80,05	80,09	C
vz 45	80,43	80,31	80,34	80,22	C
vz 53	80,00	80,24	80,08	80,04	C
vz 54	79,61	79,66	80,40	80,10	T
vz 55	79,86	79,96	79,60	80,55	C
vz 60	80,34	80,37	80,57	80,28	C
vz 66	80,12	80,22	80,13	80,03	C
vz 67	80,02	80,05	80,04	80,03	C
vz 71	79,70	79,46	79,47	79,69	T

Tabulka č. 4. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C7028T. Užitý trichologický materiál byl v anafázi.  $T_m$  buk - teplota tání izolátu bukálního stěru,  $T_m$  vl - teplota tání izolátu vlasů,  $T_m$  ax - teplota tání izolátu axilárního ochlupení,  $T_m$  pub - teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

primer C7028T			
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	nukleotid
PA 1	80,05	80,37	C
PA 6	79,61	80,34	T
PA 7	79,99	80,58	C
PA 11	79,74	79,90	T
PA 13	79,96	80,40	C
PA 15	80,11	80,43	C
PA 16	80,20	80,68	C
PA 17	80,24	80,29	C
PA 19	79,89	80,28	C
PA 21	80,37	80,27	C

Tabulka č. 5. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C7028T. Vzorky vlasů jsou v telogenní fázi. Tm buk - teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl - teplota tání izolátu vlasů. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

testování ředění vzorků - primer C14766T			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	75,71	75,74	75,71
100x	75,51	75,46	75,37
500x	75,74	75,36	75,46
1000x	75,76	75,94	75,62
5000x	75,5	75,47	75,51
10000x	75,83	75,83	75,74
20000x	75,8	75,31	NA
50000x	75,6	75,63	74,78

Tabulka č.6. Přehled výsledků teplot tání pro amplifikáty primeru C14766T. Testování teploty tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci nDNA 1ng / 1μl, ředění uvedeno v tabulce

	primer C14766T				
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	75,58	75,46	75,56	75,74	T
vz 30	76,55	77,98	76,28	76,54	C
vz 45	76,32	76,55	76,64	76,41	C
vz 53	76,65	76,79	76,16	76,39	C
vz 54	75,66	75,72	NA	75,77	T
vz 55	75,50	75,67	74,83	74,94	T
vz 60	76,19	76,28	76,54	76,27	C
vz 66	76,74	76,46	76,53	76,29	C
vz 67	76,12	76,09	76,20	76,48	C
vz 71	75,33	75,75	75,66	75,87	T

Tabulka č. 7. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C14766T. Užitý trichologický materiál byl v anafázi. Tm buk - teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl - teplota tání izolátu vlasů, Tm ax - teplota tání izolátu axilárního ochlupení, Tm pub - teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

	primer C14766T		
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	nukleotid
PA 1	76,17	76,00	C
PA 6	75,53	75,86	T
PA 7	76,20	76,25	C
PA 11	75,47	75,85	T
PA 13	75,86	75,88	T
PA 15	75,48	75,29	T
PA 16	75,84	75,63	T
PA 17	76,35	76,09	C
PA 19	75,79	75,68	T
PA 21	75,40	75,30	T

Tabulka č. 8. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C14766T. Vzorky vlasů jsou v telogenní fázi. Tm buk - teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl - teplota tání izolátu vlasů. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

## 12.2. Seznam použitých chemikálií

V textu	Název (výrobce)
dH <sub>2</sub> O	DNA, RNA Nucleasa - free Water (Eppendorf AG)
DNA IQ	DNA IQ <sup>™</sup> (Promega)
DNA Remover	DNA - Remover <sup>™</sup> (Minerva Biolabs)
ExoSAP-IT	ExoSAP-IT <sup>®</sup> For PCR Product Clean-Up (Affymetrix)
Chelex 100	Chelex <sup>®</sup> 100 Resin (Bio - Rad Laboratories)
Incidur Spray	Incidur <sup>®</sup> Spray (Ecolab)
Inkubační pufr	Incubation buffer, součást Tissue and Hair Extraction Kit (Promega)
Izolační sada Tissue and Hair Extraction Kit	Tissue and Hair Extraction Kit (Promega)
Kit BigDye Xterminator	BigDye <sup>®</sup> XTerminator <sup>™</sup> Purification Kit (Applied Biosystems)
Lyzační pufr	Lysin buffer, součást DNA IQ <sup>™</sup> (Promega)
PK	Proteináza K (Sigma - Aldrich Co.)
Promývací pufr	Wash buffer, součást DNA IQ <sup>™</sup> (Promega)
Quantifiler Human	Quantifiler <sup>™</sup> Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)
Uvolňovací pufr	Elution buffer, součást DNA IQ <sup>™</sup> (Promega)

### 12.3. Seznam použitých přístrojů

V textu	Název (výrobce)
1,5 ml zkumavka	zkumavka 1,5 ml (Eppendorf AG)
96 jamková destička	MicroAmp <sup>®</sup> optical 96well reaction plate with barcode (App. Bio.)
Centrifuga	Centrifuge 5415D (Eppendorf AG)
Kapilára sekvenátoru	36 cm kapilára s polymerem POP-4 <sup>™</sup>
LightCycler	LightCycler <sup>®</sup> 480 II (Roche)
Mikroskop	Olympus BX50 F-3
Rotační třepačka	HIM20 (Grant Boekel)
Sekvenátor	ABI PRISM <sup>®</sup> 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
tampon Dispolab	Dispolab (Copan Italia)
Termocycler GA9700	GeneAmp <sup>®</sup> PCR Systém 9700 (Applied Biosystems)
Thermocyler Verity	Veriti <sup>™</sup> 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Velká centrifuga	Centrifuge 5810 (Eppendorf AG)
Vortex	IKA <sup>®</sup> Vortex Genius 3 (Vitrium <sup>®</sup> )
Vyhřívaná třepačka	Themomixer Comfort 1,5 ml (Eppendorf AG)